



Efeito da Suplementação Enzimática de Dietas à Base de Centeio, em Diferentes Períodos do Ciclo Produtivo, nas Performances de Frangos de Carne

Carina Alexandra Infante dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestrado em
Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Orientador: Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo

Júri:

Presidente: - Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Vogais: - Doutor Carlos Mendes Godinho de Andrade Fontes, Professor Associado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa;
- Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2008

AGRADECIMENTOS:

Quero aqui expressar os meus agradecimentos a todos os que me apoiaram, encorajaram e ajudaram, ao longo deste projecto.

À Dra. Madalena Lordelo, minha professora e orientadora, pela paciência, ajuda, conselhos e orientação, ao longo de todo o trabalho.

À Quinta da Freiria por tão amavelmente ter fornecido os pintos do dia.

Ao Departamento de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia por me ter disponibilizado as condições (instalações e material) e a ajuda, indispensáveis à execução experimental.

A todas as pessoas do Departamento de Produção Animal que me ajudaram e ensinaram muitas coisas, tais como o Sr. José António, e o Sr. Paixão.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa por todo o apoio fornecido, e também a nível de instalações laboratoriais. Especialmente a Patrícia Ponte e Teresa Ribeiro por toda a simpatia e ajuda.

À minha família, pelo apoio, confiança, compreensão e paciência, nomeadamente aos meus pais e avós, por tudo o que fazem por mim.

Aos meus colegas, amigos, e alguns conhecidos pelo apoio e ajuda dadas durante, e após o ensaio. Especialmente ao José Silvestre, Sandra Gaspar, e Sandra Morais.

RESUMO:

As paredes celulares vegetais são estruturas extremamente complexas, cujos principais constituintes são os polissacáridos não amiláceos. Os monogástricos não produzem enzimas capazes de degradar estes polissacáridos estruturais, obtendo um menor aproveitamento dos alimentos à base de cereais. A incorporação de enzimas alimentares tem ganho uma importância cada vez maior.

Neste estudo foram utilizados cinco tratamentos à base de centeio, onde a única variável, foi a introdução ou não de xilanases no alimento composto, para verificar se poderíamos restringir a enzima a períodos específicos da vida dos frangos. Foram registados pesos vivos e consumos alimentares, e *post mortem* foram analisados o peso ou comprimento de alguns compartimentos gastrointestinais, viscosidade e actividade enzimática do digesta.

Os resultados demonstram que o tratamento com adição enzimática nas duas primeiras semanas do ciclo, não diferiu significativamente ($p > 0,05$), na maioria dos parâmetros analisados, dos tratamentos com adição enzimática nas três primeiras semanas e nas quatro semanas do ciclo produtivo.

Os resultados globais indicam que só será necessária suplementação enzimática nas duas primeiras semanas da vida dos frangos mas, mais estudos deverão ser realizados no futuro.

Palavras chave: Frangos de carne, centeio, polissacáridos não amiláceos, xilanase, viscosidade do digesta, performance dos frangos.

ABSTRACT:

Plant cell walls are complex structures, whose main constituents are non-starch polysaccharides. The monogastric animal does not produce enzymes capable of degrading these structural polysaccharides and therefore, a low level of cereals may be used. The incorporation of exogenous enzymes gained increasing importance.

In this study five rye-based treatments were used, where the only variable was the incorporation or not of xylanases in the diet, into specific periods of the production cycle of broilers. Body weights and food consumption were monitored, and *post mortem* parameters were analyzed, such as weight or length of some gastrointestinal compartments, viscosity and enzymatic activity of the digesta.

The results show that performance with a rye-based diet with enzyme supplementation in the first two weeks of the trial, was not significantly different ($p > 0.05$) to performance with a rye-based diet with enzyme supplementation in the first three weeks and, during the four week trial.

The results indicate that it is only necessary enzyme supplementation in the first two weeks of the production cycle of broilers, but more studies should be held in the future.

Key words: Broilers, rye, non-starch polysaccharides, xylanase, digesta viscosity, broiler performance.

EXTENDED SUMMARY:

In the poultry industry there are frequent periods of financial instability, arising from higher prices of feed ingredients. There is an increasing interest in alternative raw materials, to reduce the price of feed.

Plant cell walls are extremely complex structures. Its main constituents are the non-starch polysaccharides (NSP). The monogastric animal does not produce enzymes capable of degrading these structural polysaccharides and therefore, without exogenous enzymes a lower level of cereals may be used.

Cereals are the feed ingredients that provide birds with most of energy due to its high level in carbohydrates, but also contain significant quantities of proteins, fats and minerals. Those that are used for feeding are classified into viscous cereals such as rye, wheat, barley, oats or triticale, and not viscous as maize and sorghum. Rye is not a common cereal grain in poultry feed because, in addition to increasing the viscosity of the digesta, it decreases digestibility, which makes the digestive transit slower. However, its use may be important in areas of the world where there is a shortage of supply of other cereals used in animal feed such as maize, wheat or barley.

It is generally believed that the water-soluble arabinoxylans, a class of NSP, are the main antinutritive factors in rye, responsible for the reduction of body weight gain and poorer feed utilization, especially in young chicks. The incorporation of xylanases from microorganisms capable of degrading the cell wall of plants, in the diets given to farm animals, has therefore gained increasing importance. Chick performance is greatly improved by the addition of exogenous xylanase to rye-based diets. Enzyme “cocktails” in diets with raw materials of high viscosity such as rye, barley, wheat and triticale, has been routinely used in the European poultry industry ever since the 1980’s, yielding technical and economic advantages. In general, the exogenous enzymes used as additives in feed for birds do not have direct nutritional function. They are characterised by increasing the availability of storage polysaccharides, fat, and protein, normally protected by the cell wall polysaccharides, known as NSP. Increased viscosity contributes to the development of intestinal diseases such as coccidiosis and necrotic enteritis. In addition to the nutritional problems mentioned above it can also increase the incidence of moisture in the beds, with rising levels of ammonia.

The digestive organs have an inherent ability to change their morphological, physiological and biochemical characteristics in response to a change of stimuli. Some authors believe that diets based on viscous grains such as rye, result in an increase in relative size of digestive tract, others indicate a weight change.

The goal of the present study is to verify whether the use of enzymes are needed throughout the entire life of broilers, or only in specific time frames, in a rye-based diet. If it is only necessary to supplement diets during a certain period of the production cycle, there will be a reduction of cost to the producers.

In the current project performance parameters will be measured such as feed conversion, gain weight and feed intake, during the growth of broiler chickens (four weeks). In addition, in the present study, we will also analyse *post mortem* changes in the gastrointestinal tract, such as the length of the duodenum, jejunum, ileum and caeca, and weight of crop, gizzard and liver. Viscosity and enzymatic activity of the digesta will also be measured.

We used five rye-based treatments, where the only variable was the incorporation or not of xylanases in the diet. We had the treatment R0 that was a rye-based diet without enzyme supplementation during the 4-week trial; R0-1 was a rye-based diet with enzyme supplementation only in the first week of the trial; R0-2 was a rye-based diet with enzyme supplementation in the first 2 weeks of the trial; R0-3 was a rye-based diet with enzyme supplementation in the first 3 weeks of the trial and, R0-4 was a rye-based diet with enzyme supplementation during the 4-week trial.

The results show that the treatment R0-2 was not significantly different ($p > 0.05$) to treatment R0-3 and R0-4. In conclusion, the overall results indicate that it is only necessary enzyme supplementation, of a rye-based diet, in the first two weeks of the production cycle of broilers, but more studies shall be held in the future.

ÍNDICE GERAL:

| | |
|---|-----------|
| 1 – INTRODUÇÃO: | 12 |
| 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: | 14 |
| 2.1. – O CENTEIO COMO CEREAL ALTERNATIVO | 14 |
| 2.1.1 - <i>Situação do mercado dos cereais</i> | 14 |
| 2.1.2 – <i>Frangos de carne</i> | 17 |
| 2.1.3 – <i>O alimento composto</i> | 18 |
| 2.1.6 – <i>O centeio em alimento composto para aves</i> | 25 |
| 2.2 – AS ENZIMAS ALIMENTARES EM FRANGOS DE CARNE | 29 |
| 2.2.1 – <i>Mecanismos de acção das enzimas alimentares</i> | 29 |
| 2.2.2 – <i>Efeito das enzimas alimentares no tracto digestivo</i> | 32 |
| 3 – OBJECTIVOS: | 37 |
| 4 – MATERIAL E MÉTODOS: | 39 |
| 4.1 – LOCAL DO ENSAIO E ANIMAIS UTILIZADOS | 39 |
| 4.2 – O ALIMENTO COMPOSTO E TRATAMENTOS | 39 |
| 4.3 – PROCEDIMENTOS ANTES, DURANTE E APÓS O ENSAIO | 42 |
| 4.4 – ANÁLISES EFECTUADAS AO DIGESTA: | 43 |
| 4.4.1 – <i>Análise de viscosidade</i> | 43 |
| 4.4.2 – <i>Análise da actividade enzimática</i> | 44 |
| 4.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA | 44 |
| 4.6 – ANÁLISE INTESTINAL | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 5 – RESULTADOS: | 45 |
| 5.1 - PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS | 45 |
| 5.2 – PESOS E COMPRIMENTOS DOS COMPARTIMENTOS GASTROINTESTINAIS | 47 |
| 5.3 – VISCOSIDADE DO DIGESTA | 48 |
| 5.4 – ACTIVIDADE ENZIMÁTICA | 49 |
| 5.5 – COCCIDIOSE | 51 |
| 6 - DISCUSSÃO: | 52 |
| 7 – CONCLUSÃO: | 58 |
| 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: | 60 |

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS:

| | | |
|-------------------|---|----|
| Quadro 1 – | Factores de risco que aumentam os efeitos negativos da elevada viscosidade | 22 |
| Quadro 2 – | Factores que afectam a viscosidade intestinal | 25 |
| Quadro 3 – | Viscosidades intestinal média, mínima e máxima (centipoiese) determinada em broilers com 21 dias, alimentados com dietas contendo 60% dos cereais identificados | 27 |
| Quadro 4 – | Composição base do alimento composto | 39 |
| Quadro 5 – | Composição química/nutricional do alimento composto | 40 |
| Tabela 1 – | Média dos parâmetros zootécnicos avaliados em frangos cujo alimento composto à base de centeio continha ou não suplementação de xilanases | 46 |
| Tabela 2 – | Mortalidade (%) ao longo do ensaio | 47 |
| Tabela 3 – | Peso e comprimento médios relativos dos compartimentos do tracto digestivo de aves, alimentadas com dietas suplementadas com xilanases | 48 |
| Tabela 4 – | Actividade xilanolítica ao longo dos compartimentos do tracto digestivo de aves alimentadas com dietas suplementadas com xilanases (a classificação do nível da actividade foi feita numa escala qualitativa) | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS:

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Evolução do preço de alguns cereais, desde o final de 2005 a 2008 | 15 |
| Figura 2 – Mercado dos cereais – perspectivas para os mercados agrícolas e a entrada para a EU-25 (2004-2011) | 16 |
| Figura 3 – Desenvolvimento e perspectivas dos mercados de centeio (milhões de toneladas), 1995-2011 | 17 |
| Figura 4 – Imagem representativa de um grão de cereal | 19 |
| Figura 5 – Imagem microscópica do centeio | 19 |
| Figura 6 – Classificação dos hidratos de carbono | 21 |
| Figura 7 – Polissacáridos não amiláceos nos cereais (% MS) | 23 |
| Figura 8 – Unidade estrutural dos arabinoxilanos | 24 |
| Figura 9 – Representação gráfica do efeito da concentração na dieta de, centeio e enzimas, na viscosidade (centipoiese) do ID | 26 |
| Figura 10 – Imagem representativa da acção enzimática | 29 |

| | |
|--|----|
| Figura 11 – Imagem representativa do tracto digestivo das aves | 33 |
| Figura 12 – Esquema representativo do procedimento efectuado durante o ensaio | 41 |
| Figura 13 – Esquema representativo da sala de ensaio onde se pode ver a distribuição dos diferentes tipos de tratamentos, pelas 40 gaiolas existentes | 42 |
| Figura 14 – Distribuição das viscosidades médias do conteúdo do duodeno+jejuno e do íleo, conforme o tipo de tratamento | 49 |

LISTA DE ABREVIATURAS:

FAN – Factores antinutricionais;

FAO – Food and agriculture organization;

ID – Intestino delgado;

IV – Infravermelhos;

Mio t – Milhões de toneladas

PNA – Polissacáridos não amiláceos;

PV – Peso vivo;

R0 – Tratamento em que o alimento composto à base de centeio não vai ter suplementação enzimática durante as quatro semanas do ensaio;

R0-1 – Tratamento em que o alimento composto à base de centeio vai ter suplementação enzimática durante a primeira semana do ensaio;

R0-2 – Tratamento em que o alimento composto à base de centeio vai ter suplementação enzimática durante as duas primeiras semanas do ensaio;

R0-3 – Tratamento em que o alimento composto à base de centeio vai ter suplementação enzimática durante as três primeiras semanas do ensaio;

R0-4 – Tratamento em que o alimento composto à base de centeio vai ter suplementação enzimática durante as quatro semanas do ensaio;

SE – Suplementação enzimática;

TD – Tracto digestivo;

USD/tonne – United States dollar/tonne – Dólares americanos por tonelada;

1 – INTRODUÇÃO:

Na avicultura, são frequentes os períodos de instabilidade financeira acrescidos dos altos preços dos ingredientes que compõem o alimento composto. Há assim um interesse crescente por matérias-primas alternativas, para a redução do preço do alimento composto que constitui o custo mais elevado na produção avícola.

Os cereais são os alimentos que proporcionam às aves a maior parte da energia, devido ao seu elevado teor em hidratos de carbono, embora contenham também quantidades apreciáveis de proteínas, gorduras e minerais. Os que são utilizados na alimentação das aves estão classificados em cereais viscosos como a aveia, o centeio, a cevada, o trigo ou o tritcale, e em não viscosos como o milho e o sorgo.

O centeio não é um grão de cereal comum na alimentação avícola pois, além de aumentar a viscosidade do digesta, fazendo com que a digestibilidade diminua, torna o trânsito digestivo mais lento (Bedford, 2000). Mas, a sua utilização pode ser importante em zonas do mundo onde há escassez de oferta dos outros cereais utilizados em alimento composto como o milho, trigo ou cevada.

A utilização de complexos enzimáticos em dietas com matérias-primas de alta viscosidade é frequente na indústria avícola europeia desde a década de 80, apresentando vantagens técnicas e económicas. De forma geral, as enzimas exógenas utilizadas como aditivos na alimentação de aves não possuem função nutricional directa. Caracterizam-se por aumentar a disponibilidade de polissacáridos de reserva, de gorduras e de proteínas, normalmente protegidas da actividade digestiva pelos polissacáridos da parede celular, conhecidos como polissacáridos não amiláceos (PNA) (Bedford, 1996b).

Os PNA são capazes de mobilizar grande quantidade de água quando o tipo de fibra é solúvel, aumentando a viscosidade do fluído (Lázaro *et al.*, 2003). O centeio, o trigo e o tritcale possuem grande quantidade de arabinoxilanos solúveis em água, exibindo efeito antinutricional, pelo que se adicionam enzimas exógenas nas dietas para aves. Para dietas à base de cereais com alta viscosidade utiliza-se, geralmente, complexos enzimáticos compostos por glucanase, amilase e arabinoxilanase (Bedford, 1993).

O aumento da viscosidade contribui para o desenvolvimento de doenças intestinais, como a coccidiose e enterite necrótica. Além dos problemas nutricionais já mencionados pode também, aumentar a incidência de humidade nas camas, com aumento dos teores de amónia.

Os órgãos digestivos têm capacidade inerente para mudar as suas características morfológicas, fisiológicas e/ou bioquímicas, em resposta a uma variação de estímulos. Dietas baseadas em grãos viscosos como o centeio resultam num aumento do tamanho relativo do tracto digestivo (TD) (Olkowski *et al.*, 2005). A redução da viscosidade intestinal pelo uso de enzimas exógenas, demonstrou reduzir o peso e comprimentos relativos do TD da ave em 20% (Fuente *et al.*, 1998).

No presente estudo pretendemos verificar se a utilização de enzimas é necessária ao longo de todo o ciclo produtivo dos frangos de carne ou, apenas em semanas específicas, num regime alimentar à base de centeio, para melhoria dos índices produtivos do animal. A suplementação enzimática (SE) durante um período específico do ciclo produtivo, reduziria o custo do alimento composto para os produtores de aves. Iremos também analisar algumas alterações ao nível do TD (comprimento e peso de alguns órgãos), viscosidade do digesta, e actividade enzimática do digesta nos diferentes tratamentos.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1. – O centeio como cereal alternativo

2.1.1 - Situação do mercado dos cereais

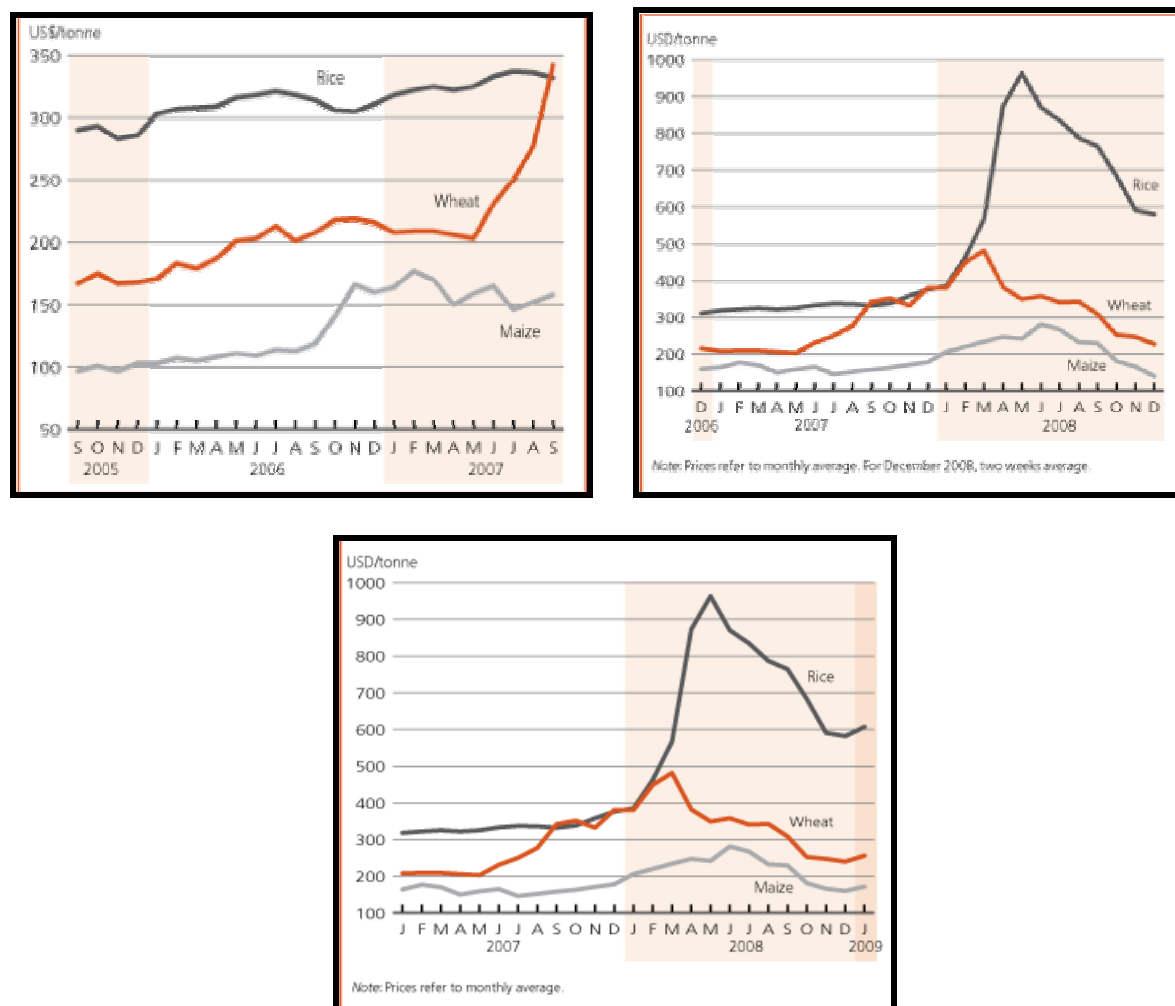
Hoje em dia há um grande interesse por matérias-primas alternativas que permitam a diminuição do preço do alimento composto.

No último ano, os preços de mercado das matérias-primas utilizadas na alimentação animal registaram aumentos muito significativos (+84% o trigo, +62% o milho, e +100% a cevada). A situação é claramente insustentável e coloca sérias dificuldades a todas as produções pecuárias, na medida em que daí já resultaram acréscimos de preços do alimento composto, e que os agentes do mercado não querem ver reflectidos nos preços do produto final.

Segundo alerta o relatório das *Perspectivas de Colheita e Situação Alimentar* pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2007), a previsão é de que os preços mundiais dos cereais permaneçam altos devido aos problemas de produção em vários dos principais países exportadores, e ao baixo nível das reservas a nível mundial. A *Food and Agriculture Organization* (FAO) calcula que muitos países pagarão mais por importar cereais dos mercados mundiais do que fizeram em anos anteriores. Os altos preços do transporte será a causa principal do aumento da factura das importações. Para a maior parte dos cereais, segundo o relatório, “as disponibilidades são muito mais reduzidas que em anos anteriores, enquanto que a procura aumenta tanto para a alimentação humana e animal, como para utilização industrial. As reservas, que já eram baixas no início da campanha, devem permanecer baixas porque a produção mundial de cereais deve ser suficiente apenas para cobrir o consumo”. O relatório acrescenta que, embora os preços dos produtos básicos agrícolas tenham subido bruscamente em 2006, em alguns casos estão a subir a um ritmo ainda maior em 2007.

Perante as *Perspectivas de Colheita e Situação Alimentar*, o estado actual dos mercados agrícolas distingue-se por um aumento dos preços mundiais de quase todos os produtos alimentares básicos, e dos destinados a alimento composto. A agro-indústria está estrangulada e vê como inevitável a subida dos preços ao consumidor. Os alimentos compostos para animais já subiram 20%, mesmo assim abaixo do crescimento dos preços dos cereais. Os preços internacionais do trigo, aumentaram drasticamente desde Junho de

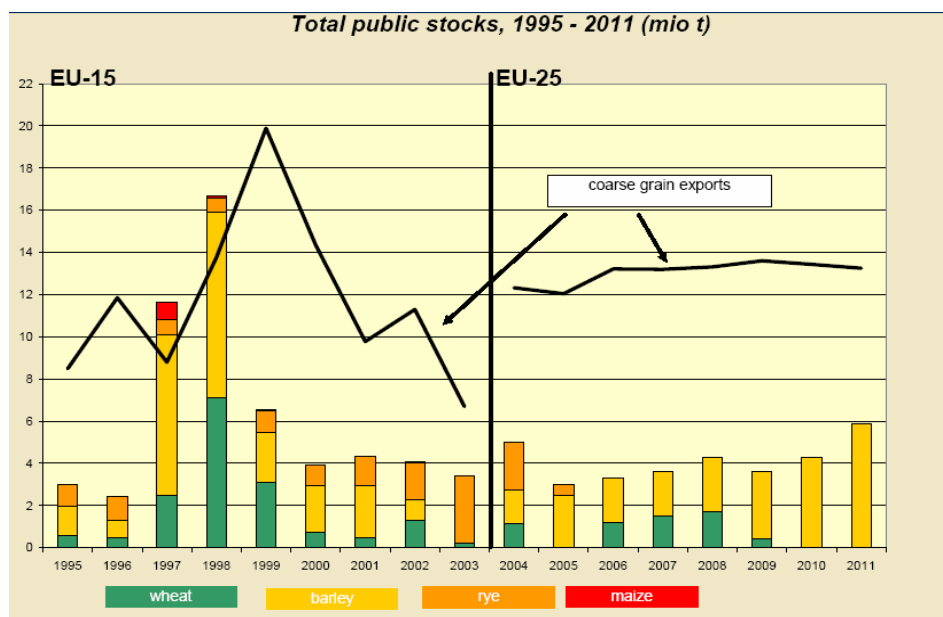
2007 batendo recordes em Setembro, em resposta ao agravamento do fornecimento mundial, níveis historicamente baixos dos stocks e na procura sustentada. As cotações do milho também estão muito acima dos níveis do ano de 2006 (FAO, 2007) (Figura 1 e 2).



Legenda:

US\$ = USD = United States dollar = dólares americanos
tonne = tonelada

Figura 1: Evolução do preço de alguns cereais, desde o final de 2005 a 2008
(www.fao.org – “Crop Prospects and Food Situation – GIEWS”)



Legenda:
mio t = million tonne = milhões de toneladas

Figura 2: Mercado dos cereais – perspectivas para os mercados agrícolas e a entrada para a EU-25 (2004 -2011)
(http://ec.europa.eu/agriculture/publi/caprep/prospects2004b/index_en.htm)

Quanto ao centeio, este é cultivado principalmente na Europa do Norte, de Leste, e Central. O seu papel no mercado de cereais baseia-se no consumo da maior parte deste, nas zonas onde é cultivado, e só é exportado para países vizinhos, e não por todo o mundo. Os níveis de produção de centeio estão a cair na maioria das nações produtoras, devido à fraca procura. No entanto, com o aumento do preço das importações de outros cereais, existe um nicho para o uso do centeio em produção avícola, principalmente nos países produtores deste cereal (Figura 3).

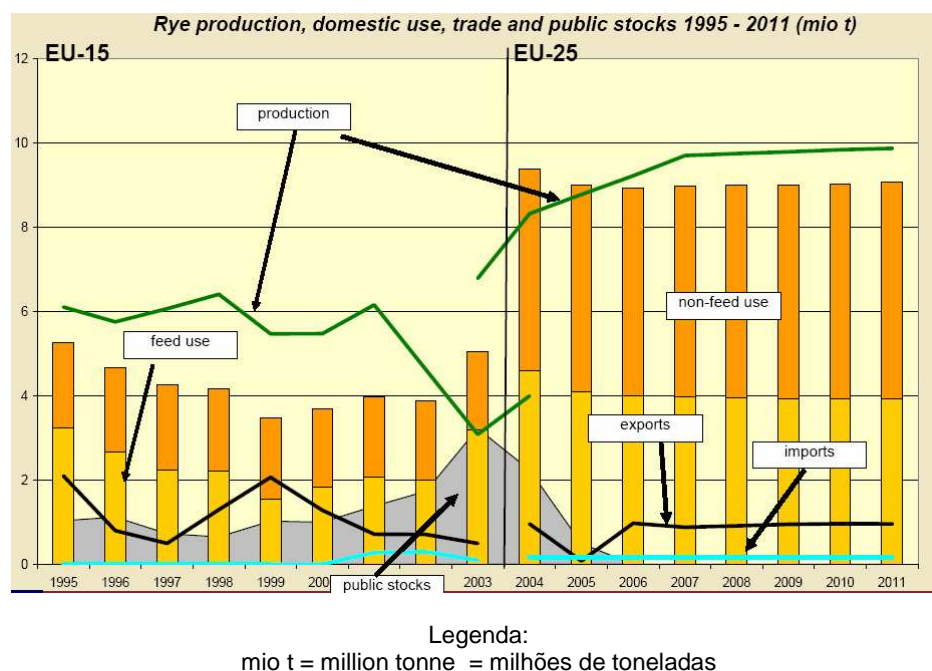


Figura 3: Desenvolvimento e perspectivas dos mercados de centeio (milhões de toneladas), 1995-2011 (http://ec.europa.eu/agriculture/publi/caprep/prospects2004b/index_en.htm)

Para comparação entre o preço do centeio e dos outros cereais utilizamos como referência o preço da Rússia e da Polónia, visto tratarem-se dos maiores países produtores de centeio. Assim, no ano de 2006 (valores mais recentes encontrados na FAOSTAT - © FAO *Statistics Division* 2009), o preço do centeio na Rússia, rondava os 91,04 dólares americanos por tonelada (USD/t), e na Polónia 124,19 USD/t. Enquanto isso, o trigo custava 112,60 e 144,51USD/t, e o milho 125,55 e 144,51USD/t, na Rússia e na Polónia, respectivamente. Situando-se assim o preço do centeio, abaixo do custo dos cereais ditos comuns na utilização em alimentos compostos para a avicultura.

2.1.2 – Frangos de carne

As melhorias no genótipo dos frangos de carne têm representado a principal razão dos ganhos no desempenho das aves (Bedford, 1996a). Uma das razões para a maior eficiência nos dias modernos nas linhas de frangos, é devido à maior capacidade de absorção por unidade de peso do TD. Isto minimiza o montante total do TD exigido, o que por sua vez reduz os custos de manutenção e permite uma maior eficiência alimentar (Bedford, 1996a), e rendimento em carcaça.

Os frangos de carne têm um baixo tempo de trânsito digestivo e são animais de crescimento rápido, com requisitos elevados em proteínas e energia. Consequentemente se houver impedimentos na absorção de nutrientes pelo TD, será prontamente detectado com uma redução na taxa de crescimento (Frigård *et al.*, 1994).

2.1.3 – O alimento composto

O alimento é o material que, após ingestão pelos animais, é capaz de ser digerido, absorvido, e utilizado. O termo alimento é comumente usado mas, os componentes capazes de serem utilizados pelos animais, são descritos como nutrientes (McDonald *et al.*, 2002).

A formulação do alimento composto envolve o uso de ingredientes alimentares para suplementar em quantidades e proporções adequadas, os nutrientes requeridos pelas aves. Os ingredientes devem ser seleccionados na base da disponibilidade, ausência de factores antinutricionais (FAN) ou tóxicos, pelo seu efeito sobre o paladar ou consumo alimentar voluntário, qualidade dos nutrientes que contêm, e preço. (NRC, 1994). As dietas dos frangos de carne são predominantemente compostas por produtos de origem vegetal. Estas fornecem aos animais a energia, proteína, vitaminas e minerais, necessários ao seu desenvolvimento em óptimas condições (Alam *et al.*, 2003).

2.1.4 - Os cereais na alimentação animal

Os cereais são as matérias-primas do alimento composto que fornecem às aves maioritariamente hidratos de carbono. Os cereais usados na alimentação das aves são designados por viscosos (centeio, cevada, trigo, tritcale), ou não viscosos (milho, sorgo, arroz).

O nome cereal é dado a um grupo de espécies pertencentes à família das gramíneas. Os grãos de cereais são essencialmente concentrados de hidratos de carbono, sendo o maior componente da matéria seca o amido, que fornece a maior parte da energia, e que está localizado no endosperma (Figura 4 e 5) (McDonald *et al.*, 2002).

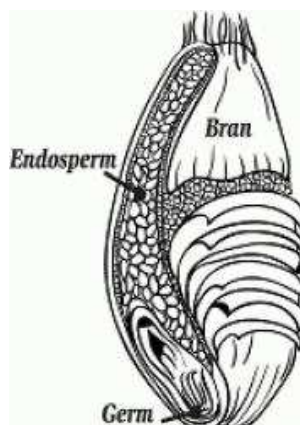


Figura 4: Imagem representativa de um grão de cereal.
(<httpwww.healthylifebread.comcontent.phpcontent=15>)

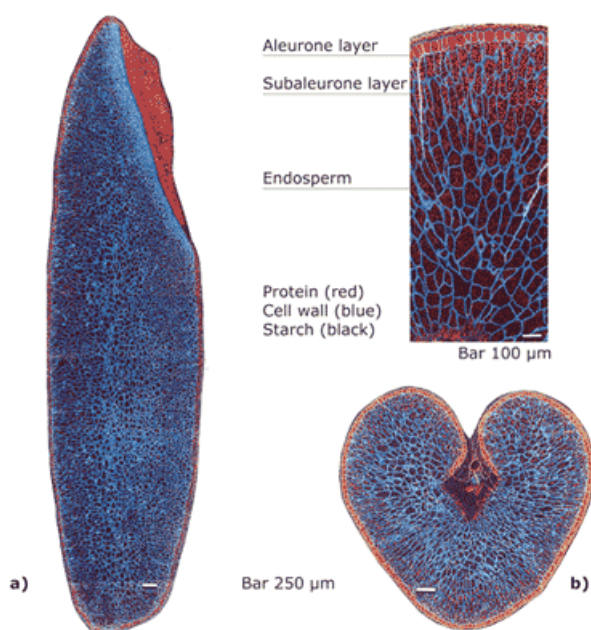


Figura 5: Imagem microscópica do centeio (Legenda de cores: vermelho=proteína; azul=parede celular; preto=amido). (<http://rye.vtt.fi/chapter3.htm>)

O nutriente de maior importância nos cereais é o amido, que é responsável por 60-70% do peso dos grãos (Bedford, 1993), e 90-95% é digerido no intestino delgado (ID) das aves através de enzimas endógenas (Williams *et al.*, 1997). Assim, para que um monogástrico aceda ao conteúdo amiláceo dos cereais, ele deve ser capaz de penetrar o duro e fibroso pericarpo, e a camada de aleurona (Figura 5). A camada de aleurona é uma

fina camada de células com uma parede celular muito espessa que delimita o endosperma. Anexado à camada de aleurona está o pericarpo, que é composto por várias camadas de células e é concebido para proteger o grão (Bedford, 1995). O último obstáculo é a parede celular do endosperma em si, que é muito mais facilmente rompida pelo processamento dos alimentos e/ou tratamento mecânico feito pelos dentes/moela, do que as paredes da aleurona (Bedford, 1995).

Os polissacáridos, uma das classes de hidratos de carbono (Figura 6), são componentes importantes dos materiais vegetais utilizados no alimento composto para monogástricos. Os polissacáridos são polímeros macromoleculares de monossacáridos juntos por ligações glicosídicas (Williams *et al.*, 1997). Os polissacáridos podem ser divididos em amiláceos e não amiláceos, e estes últimos são os relevantes no presente estudo. Os PNA incluem celulosas, hemicelulosas, e pectinas.

Os PNA podem ser divididos em solúveis e insolúveis em água, fracções que têm grande relevância para os seus valores nutricionais. Os PNA insolúveis em água podem ser considerados pouco digestíveis em frangos, e só os PNA solúveis têm o potencial de serem digeridos antes de chegarem ao intestino grosso. No entanto, nos cegos ocorre uma digestão significativa da maioria dos PNA. Os PNA solúveis são conhecidos por possuírem propriedades antinutricionais, por encapsularem os nutrientes e/ou diminuir a digestibilidade global dos nutrientes através de modificações morfológicas, fisiológicas e/ou bioquímicas, dos vários compartimentos do tubo digestivo. O decréscimo na digestibilidade de nutrientes resulta numa diminuição da energia metabolizável aparente da dieta, com um aumento elevado do índice de conversão alimentar (Williams *et al.*, 1997).

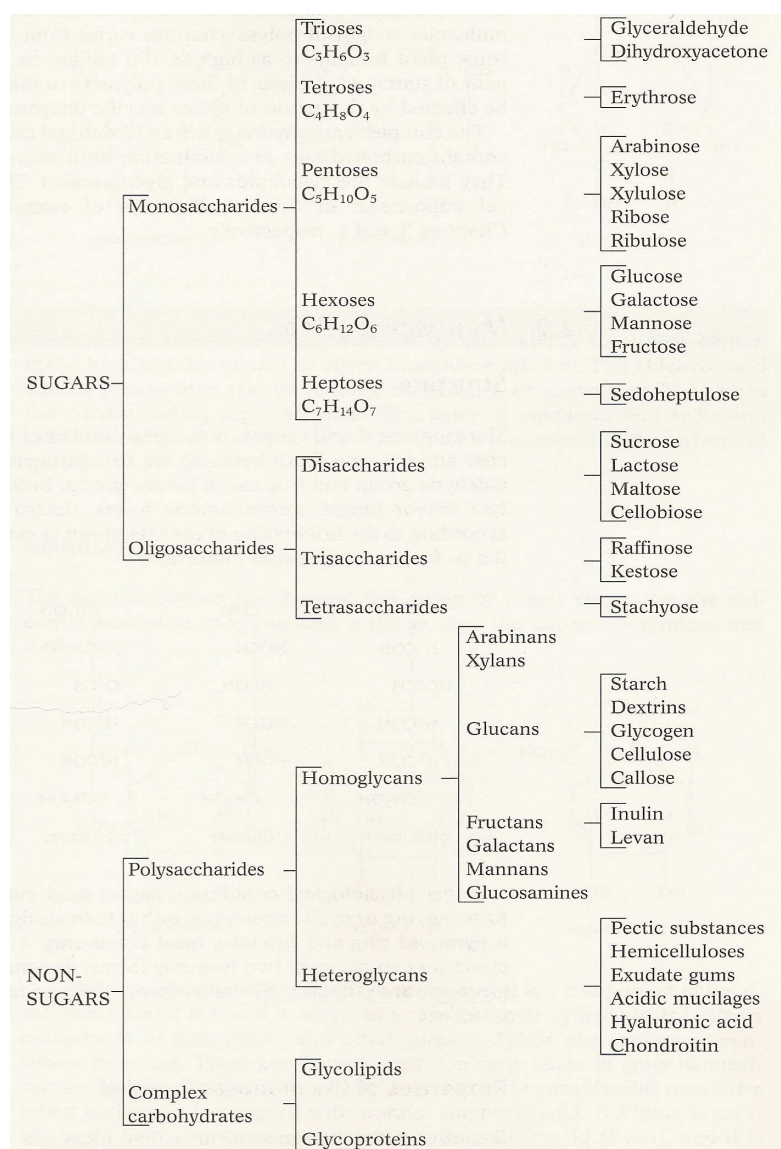


Figura 6: Classificação dos hidratos de carbono (McDonald *et al.*, 2002).

2.1.5 – Componentes antinutricionais

Muitos dos compostos orgânicos dos alimentos estão na forma de grandes moléculas insolúveis, que têm de ser quebradas em compostos mais simples antes de poderem atravessar a membrana mucosa do TD, para o sangue. O processo de quebra das moléculas é chamado digestão, e a passagem dos nutrientes digeridos através da membrana mucosa, de absorção (McDonald *et al.*, 2002).

A taxa digestiva de um alimento para animais e a absorção dos produtos da digestão, reside na formação de um complexo entre as enzimas digestivas e seu substrato e subsequente libertação do seu produto. Além disso, os produtos da digestão devem passar

pelo lúmen intestinal através dos enterócitosⁱ, para a absorção ocorrer. Assim, a difusão dos substratos e produtos através do intestino são essenciais para uma rápida digestão mas, à medida que a viscosidade de uma solução aumenta, a taxa de difusão diminui. Além disso, quanto maior o tamanho molecular do soluto, menor é a taxa de difusão. Estas duas observações contribuem para a descoberta de que a digestão da gordura é particularmente baixa nos pintos alimentados com centeio e aveia, provavelmente devido à relativa grande dimensão das micelas de gordura no intestino (Quadro 1). O animal tem alguma capacidade para compensar essa redução na capacidade digestiva através do aumento da produção de enzimas digestivas (Bedford, 1995).

Quadro 1: Factores de risco que aumentam os efeitos negativos da elevada viscosidade.
(Bedford, 1996b)

| Resposta | Direcção da resposta com o aumento da viscosidade | Considerações |
|--|---|--|
| Digestibilidade da proteína/amido | Negativa | Mais aparente em aves jovens quando a capacidade digestiva é limitada. |
| Digestibilidade lipídica | Negativa | Riscos maiores com aves mais velhas desde que os níveis de lípidos aumentam e mais gorduras saturadas são usadas. |
| Competição microbiana por nutrientes ileais | Aumento | Riscos maiores em aves mais velhas com flora mais madura e em ambientes "sujos". |
| Provisão microbiana de energia provinda dos ácidos gordos voláteis cecais | Diminuição | Aves mais velhas com cegos mais maduros são mais sensíveis. O uso de enzimas fornece oligossacáridos para fermentação. |

A eficiência da utilização do trigo, aveia, cevada e centeio pelas aves é normalmente limitado pela presença de FAN. Tais FAN são normalmente os PNA (Figura 7), classificados em arabinoxilanos e β -glucanos. Os arabinoxilanos são constituídos por uma estrutura linear de xilose com arabinose, e são responsáveis pela maior parte da baixa performance encontrada em aves alimentadas com dietas à base de centeio ou de trigo. Os β -glucanos, polímeros lineares de glucose com dobras na sua estrutura, são responsáveis pelos maus índices produtivos em aves alimentadas com aveia e cevada. Ambos exercem os seus efeitos negativos na digestão pela criação de grandes malhas de polímeros de PNA, que resultam num aumento da viscosidade. Tal aumento resulta numa redução da taxa de

ⁱ - Tipo de célula epitelial da camada superficial do intestino delgado e intestino grosso. Estas células podem quebrar moléculas e transportá-las para dentro dos tecidos.

digestão e absorção de nutrientes, aumento da actividade microbiana no intestino, redução no consumo alimentar, e aumento da humidade das camas. Enzimas exógenas, como as xilanases e β -glucanases podem aliviar esses problemas através da redução do tamanho molecular do substrato alvo, e por sua vez reduzir a viscosidade dos conteúdos do intestino, permitindo uma digestão mais eficiente (Francesch *et al.*, 2002). Diferentes plantas baseadas no seu teor total em PNA foram classificadas do teor mais baixo ao mais elevado como se segue: arroz, sorgo, milho, trigo, triticale, centeio e cevada (Williams *et al.*, 1997).

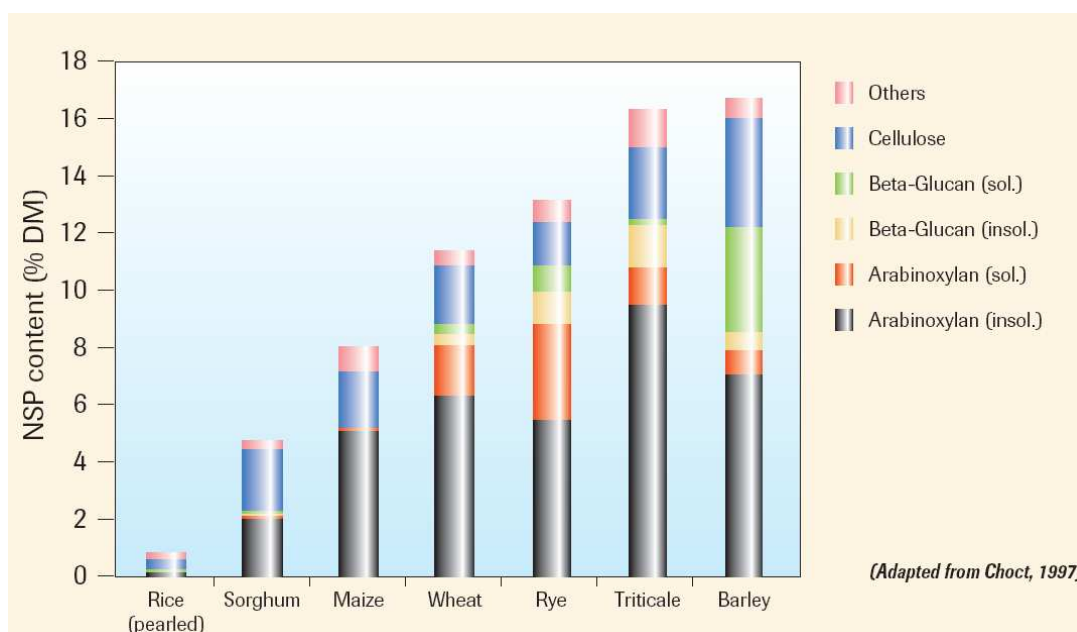


Figura 7: Polissacáridos não amiláceos nos cereais (% MS)

(http://www.dsm.com/en_US/downloads/dnp/51696_Ronozyme_WX.pdf)

A redução da viscosidade alcançada pela actividade de enzimas alimentares é responsável pela maior parte das melhorias dos índices produtivos observados em frangos alimentados com cereais de alta viscosidade (Odetallah *et al.*, 2003). Os PNA referem-se aos compostos que não têm amido, e a sua natureza química difere de um ingrediente para outro. Estes compostos variam em solubilidade e viscosidade, e portanto, compostos individuais têm efeitos diferentes sobre parâmetros digestivos e parâmetros produtivos. Para destruir as grandes malhas de polímeros de PNA é necessário quebra-los em pedaços menores (Bedford, 1995). A extensão de degradação depende da conformação dos polímeros e da sua associação estrutural com os componentes não carbohidratados, tais como a lenhina (McDonald *et al.*, 2002).

O conteúdo de PNA nas plantas varia não só com as espécies vegetais, mas também com o genótipo ou cultivar da mesma espécie. Além disso, os factores ambientais precedentes à colheita, e condições de armazenamento após a colheita, podem influenciar o conteúdo em PNA (Williams *et al.*, 1997).

Os principais PNA do centeio são os pentosanosⁱⁱ, estes abrangem principalmente os arabinoxilanos (Figura 8), que estão ligados a outros componentes das paredes celulares (Jaroni *et al.*, 1999). Os arabinoxilanos solúveis são capazes de absorver mais de 10 vezes o seu próprio peso em água, formando soluções altamente viscosas. É essa viscosidade dos arabinoxilanos que confere a sua actividade antinutritiva. O efeito antinutritivo é manifestado por um abaixamento da utilização de nutrientes, acompanhado por um fraco crescimento dos animais (Alam *et al.*, 2003).

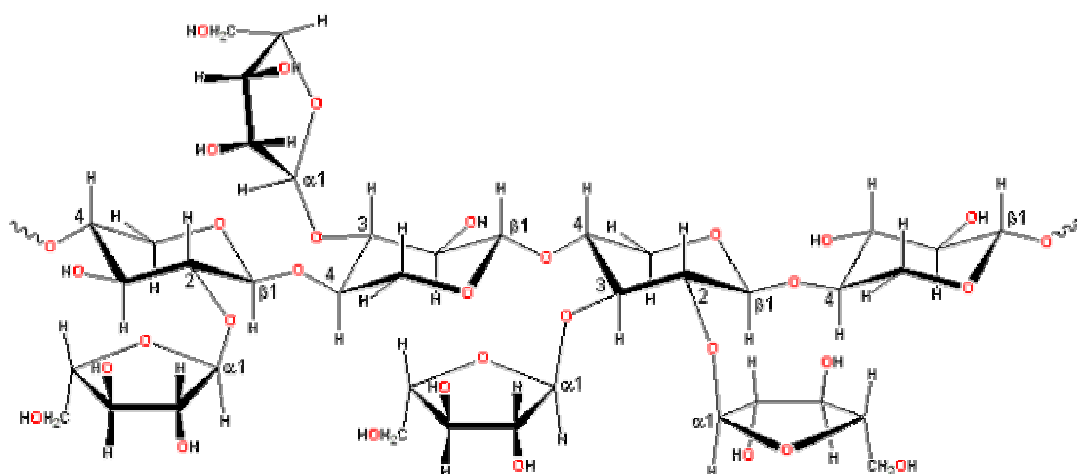


Figura 8: Unidade estrutural dos arabinoxilanos.

(<http://www.lsbu.ac.uk/water/images/hyax.gif>)

Os efeitos antinutricionais dos PNA são atribuídos em parte às mudanças na viscosidade do digesta. A viscosidade intestinal é geralmente influenciada por (Bedford, 1996a): 1) Nível de inclusão do grão – quanto maior for o nível de inclusão, maior a viscosidade intestinal – a relação é exponencial; 2) Genótipo do grão e o ambiente em que cresce; 3) Processamento da dieta – granulados tendem a aumentar a viscosidade intestinal; 4) Idade da ave – aves mais velhas, a medida da viscosidade é inferior (Quadro 2).

ⁱⁱ - Polissacáridos com cinco átomos de carbono (pentoses), e unidades de xilose.

Quadro 2: Factores que afectam a viscosidade intestinal (Bedford, 1996b).

| Factor | Efeito na viscosidade |
|----------------------------------|--|
| Variedade do grão | Variável |
| Clima de produção do grão | Variável |
| Processamento da dieta | Temperaturas mais elevadas aumentam a viscosidade. |
| Nível de inclusão do grão | Níveis elevados de inclusão aumentam a viscosidade. |
| Raça da ave | Raças diferem na viscosidade intestinal em dietas idênticas. |
| Idade da ave | A viscosidade diminui com a idade. |

Embora a viscosidade intestinal seja conhecida por diminuir com a idade, esta tendência é compensada marcadamente pela maior colonização bacteriana do tubo digestivo em aves mais velhas, que podem tirar proveito do ambiente viscoso (Bedford, 1996).

2.1.6 – O centeio em alimento composto para aves

A formulação típica de alimento composto para animais é bastante variável e depende do custo dos ingredientes, o que por sua vez, está dependente da sua disponibilidade.

O centeio não é cereal comum na alimentação avícola pois, além de aumentar a viscosidade do digesta, fazendo com que a digestibilidade diminua, torna o trânsito digestivo mais lento (Bedford, 2000). Mas, a sua utilização pode ser cada vez mais tida em conta devido ao aumento de preço, e à escassez de oferta dos outros cereais ditos como mais utilizados na formulação de alimento composto, como o milho, trigo e cevada. No entanto, o uso de centeio em dietas de aves é relativamente comum em algumas partes da Europa de Leste (Bedford, 1995).

A maioria dos trabalhos dos anos 80 e no início de 90 estudam dietas à base de cevada e centeio. Isto deve-se ao facto de estas dietas serem muito parecidas entre si ao nível da sua constituição em PNA. Com isso pode-se verificar melhor a resposta da cevada e do centeio, à celulase ou xilanase, respectivamente, que em outros cereais. Com estudos subsequentes ficou provado o sucesso do uso de carbohidrases e proteases, em aplicações na alimentação animal (Bedford, 2002).

As fontes de energia primária em dietas comerciais de frangos têm sido os tradicionais cereais de alta energia, o milho e o trigo. A cevada e o centeio que contêm níveis mais baixos de energia biodisponível, têm recebido muito limitada utilização nas dietas no passado. Em altas concentrações, dietas com estes grãos têm consistentemente resultado em desempenhos relativamente pobres e incontrolláveis condições nas camas, causados por excreta viscoso (Guenter, 1993). É sabido que, apesar da melhor composição de aminoácidos das proteínas, o valor alimentar do centeio é inferior em comparação com os outros cereais, especialmente quando dados a jovens frangos pois estes ainda não possuem um TD muito desenvolvido (Józefiak *et al.*, 2007). Os FAN presentes nos alimentos podem ser polissacáridos, complexos proteicos ou misturas de ambos. Medir a viscosidade do digesta pode ser um indicador da presença destes FAN. Quanto maior for o conteúdo destes factores na alimentação, maior a viscosidade do digesta (Odetallah *et al.*, 2003) (Figura 9 e Quadro 3). No entanto, esta proporcionalidade não é uma regra, pois depende sempre do cereal utilizado. Como por exemplo a cevada que tem uma maior percentagem de PNA totais que o centeio mas, é o centeio que torna o digesta das aves mais viscoso pois tem uma maior capacidade de retenção de água.

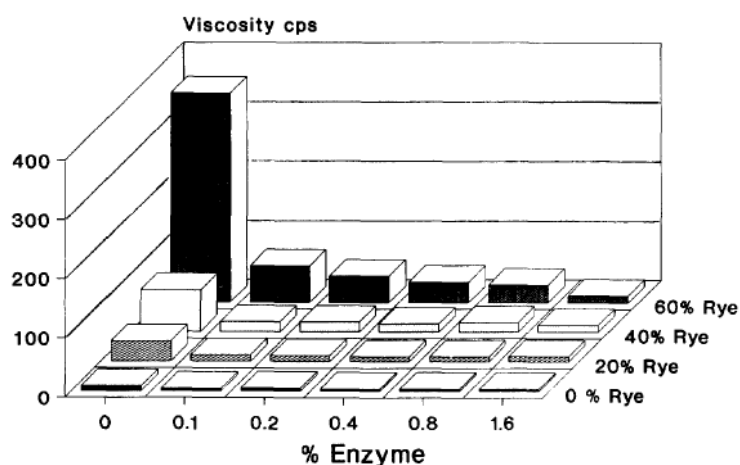


Figura 9: Representação gráfica do efeito da concentração na dieta, de centeio e enzimas, na viscosidade (centipoise) do intestino delgado (Bedford, 1993).

Quadro 3: Viscosidades intestinal média, mínima e máxima (centipoise) determinada em broilers com 21 dias, alimentados com dietas contendo 60% dos cereais identificados (Bedford, 1996b).

| Cereal | Mínimo | Máximo | Média |
|-----------|--------|--------|-------|
| Milho | 1,5 | 4,5 | 2,4 |
| Trigo | 3 | 45 | 12 |
| Triticale | 5 | 40 | 16 |
| Cevada | 6 | 225 | 25 |
| Centeio | 70 | >1000 | >250 |

O problema nas paredes celulares do endosperma dos cereais são os PNA solúveis que a incrustam (Bedford, 1995). Esta fracção de PNA solúveis em água pode formar complexos com as enzimas intestinais, impedindo-as de reagir com os substratos (Brenes *et al.*, 2002). Uma compreensão mais detalhada da estrutura destes complexos viscosos e como eles aparecem no intestino permitirá a concepção de mais enzimas alimentares específicas para aves (Bedford, 1995).

Uma dieta que contenha na sua constituição centeio, vai levar a que a taxa de digestão de todos os nutrientes possa ser suficientemente comprometida, para que a dieta não tenha os nutrientes requeridos necessários para permitir um óptimo crescimento. Efectivamente, a dieta é deficiente em nutrientes. Nesses casos o uso de uma enzima que reduza a viscosidade, vai produzir resultados que proporcionem o suavizar da deficiência de nutrientes (Bedford, 2002). Foi observado que com o aumento da inclusão de centeio há redução da taxa de crescimento e da eficiência de conversão alimentar. Muitos estudos têm demonstrado os benefícios da adição de enzimas xilanase para dietas à base de centeio, frequentemente atribuídos a uma redução na viscosidade intestinal (Bedford e Classen, 1992). Os efeitos da viscosidade do digesta no desempenho animal só podem ser visíveis quando a alimentação animal contém moderados a elevados níveis de polissacáridos solúveis, como em dietas à base de centeio. Sob estas condições, as diferenças de desempenho entre os animais suplementados e não-suplementados podem desaparecer em 14 dias (Fontes *et al.*, 2004).

As dietas à base de centeio levam a um aumento da ingestão de água, e da razão entre a água e o consumo alimentar. Isto pode ser parcialmente explicado pela capacidade de retenção de água dos PNA. O aumento da viscosidade do digesta é assim, o principal mecanismo pelo qual os PNA solúveis em água exercem as suas propriedades antinutritivas

(Mathlouthi *et al.*, 2002). Esta viscosidade altera a digestão e os processos de absorção pelo aumento do tempo do trânsito gastrointestinal, que por sua vez reduz a difusão das enzimas digestivas, aumenta a secreção de enzimas endógenas, e estimula a proliferação bacteriana no ID (Mathlouthi *et al.*, 2001). Esta interação entre dieta e a microflora no lúmen intestinal provavelmente interfere com os processos digestivos e absorptivos (Mathlouthi *et al.*, 2002). Reduzir a taxa de digestão não é o único problema encontrado quando a viscosidade intestinal aumenta. Apesar do aumento da motilidade no tubo digestivo associada ao ambiente intestinal viscoso, a taxa de passagem do alimento, é conhecida por ser significativamente reduzida em aves alimentadas com dietas baseadas em centeio. O resultado é a diminuição da taxa de assimilação dos nutrientes. Devido ao trânsito alimentar ser retardado, as bactérias intestinais são capazes de se multiplicar e migrarem para zonas superiores do ID. A microflora intestinal vai também utilizar o amido e as proteínas no digesta, e efectivamente competir com o hospedeiro por nutrientes. Adicionalmente, algumas bactérias intestinais produzem ácidos biliares degradando enzimas o que reduzirá ainda mais as capacidades de digestão lipídica do hospedeiro. Como consequência, aves alimentadas com dietas à base de centeio são propensas a deficiências de vitaminas lipossolúveis (raquitismo é particularmente comum), porque as vitaminas lipossolúveis são absorvidas pelas micelas lipídicas. Além disso, porque se pensa que os ácidos biliares estabilizam as proteases pancreáticas no lúmen intestinal, a digestão proteica será comprometida futuramente (Bedford, 1993). Resumidamente, a alimentação com centeio favorece a desconjugação dos ácidos biliares no conteúdo intestinal e reduz a absorção de vitamina D3, e portanto, reduz a mineralização óssea (Lázaro *et al.*, 2004). Foi também observado que elevadas quantidades de centeio em dietas para frangos causam problemas de patas (Pan *et al.*, 1998). Concluimos assim, que a inclusão do centeio em dietas de frangos aumenta a viscosidade do digesta, prejudicando o desempenho, e aumenta a incidência de doenças nas patas (Lázaro *et al.*, 2004).

Visto que os aumentos da viscosidade intestinal são mais prejudiciais para aves jovens, a adição de ingredientes viscosos podem ser utilizados em dietas de crescimento e acabamento em maiores concentrações do que em dietas *starter* (Lee *et al.*, 2003). Estudos demonstraram ainda que os efeitos negativos do centeio podem ser superados, mas não totalmente, quer por adaptação dos pintos à dieta ou um aumento da sua idade e/ou o desenvolvimento e maturação do sistema digestivo. A adição de enzimas porém, melhora todos os parâmetros produtivos num maior grau naqueles que ocorrem entre a primeira e a terceira semana do período de alimentação (Boros *et al.*, 2002).

2.2 – As enzimas alimentares em frangos de carne

2.2.1 – Mecanismos de acção das enzimas alimentares

Uma compreensão básica das enzimas é necessária antes de poderem ser utilizadas de forma eficaz. Biologicamente, as enzimas são proteínas funcionais que catalisam ou aceleram o ritmo de reacções químicas específicas (Ferket, 1993). São proteínas de alto peso molecular (entre 10.000 e 500.000 Daltons), e como todas as proteínas, são sensíveis ao ambiente físico-químico, que poderá modificar a sua actividade (Sabatier e Fish, 1996).

A actividade enzimática (Figura 10) é uma medida da taxa de transformação de substrato (taxa de reacção), ou seja, a quantidade de substrato transformado ou produto formado por unidade de tempo. As condições de reacção são fixas, uma vez que a taxa ou reacção é proporcional, dentro de certos limites à quantidade de enzima (Sabatier e Fish, 1996). As enzimas são classificadas pelos substratos sobre os quais elas reagem, e pela sua especificidade (Ferket, 1993).

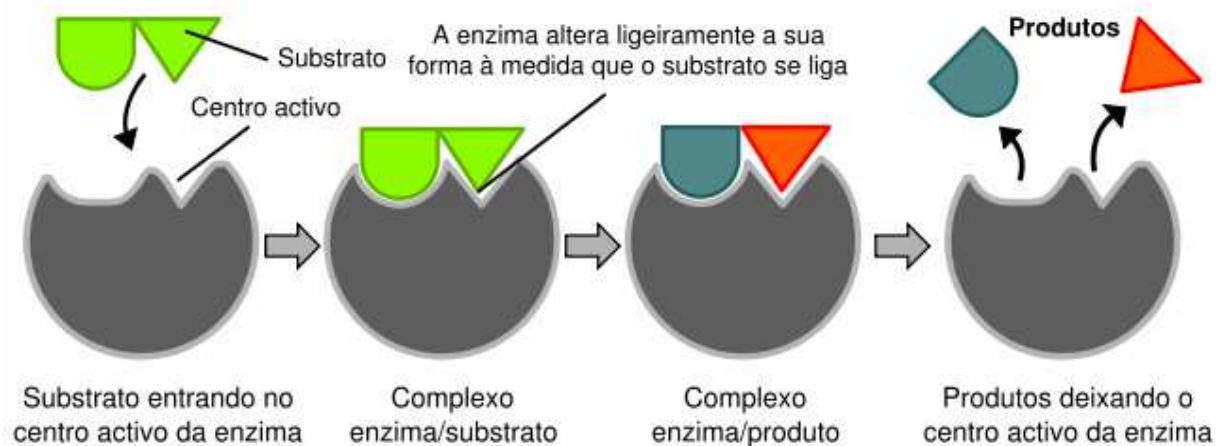


Figura 10: Imagem representativa da acção enzimática.

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/ba/Induced_fit_diagram_pt.svg/648px-Induced_fit_diagram_pt.svg.png)

A função das enzimas é a sua acção catalítica, em contraste com outros aditivos alimentares tais como vitaminas, promotores de crescimento ou aminoácidos, cuja eficácia é o resultado do seu metabolismo (Sabatier e Fish, 1996). A rápida taxa das reacções

catalisadas por enzimas é devido à alta afinidade destas para o substrato, que se reflecte na ligação do substrato sobre a enzima, e a libertação do produto convertido (Sabatier e Fish, 1996). A ligação da enzima ao substrato depende da conformação da proteína, que é afectada pelo pH e temperatura. Esses factores também influenciam directamente a reactividade (Sabatier e Fish, 1996).

As enzimas utilizadas para a suplementação alimentar consistem em misturas complexas de biocatalisadores a partir da fermentação de vários microrganismos (Fontes *et al.*, 2004). Assim, os factores que devem ser considerados quando estas são usadas, consistem nos seguintes pontos: 1) A SE deve conter um bom espectro de enzimas, para que os efeitos antinutritivos do substrato alvo sejam neutralizados (β -glucanase na cevada e aveia, e xilanases para o centeio, trigo e tritcale); 2) O suplemento deve conter quantidades adequadas, das enzimas adequadas, de modo a neutralizar os efeitos dos factores antinutritivos da dieta; 3) Diferentes cereais contêm quantidades diferentes de FAN sensíveis às enzimas. Portanto, a resposta ao tratamento enzimático pode variar dentro de um determinado cereal; 4) Os resultados são afectados por classe e idade das aves; 5) As enzimas não devem ser inactivadas pelo tratamento, pelo baixo pH, ou enzimas digestivas no TD (Marquardt *et al.*, 1996).

Os animais não possuem a capacidade enzimática para digerir celulose, arabinosilanos, β -glucanos, ou pectinas. Muito interesse centrou-se sobre este facto e sobre as formas de eliminar esses polímeros que encapsulam os conteúdos desejados do endosperma (Bedford, 1995). As enzimas exógenas podem melhorar a digestão por alargar as capacidades do próprio pinto para a digestão das proteínas, amido, gordura. Além disso, afectam através da eliminação dos FAN, que interferem com o processo de digestão, ou pela ingestão de componentes fibrosos que, de outro modo, passariam por todo o TD sem serem digeridos. As enzimas exógenas podem ser encaradas como tendo um papel significativo, não só em nutrição animal, mas com certeza na saúde do aparelho digestivo (Bedford, 1996b).

A indústria da alimentação das aves está cada vez mais receptiva ao uso de SE. Tal como no interesse e compreensão do uso destes avanços, o desenvolvimento de misturas de enzimas específicas para o hospedeiro, são feitas à medida dos objectivos nutricionais, ambientais ou de gestão. A adição de enzimas alimentares também pode melhorar o valor produtivo do alimento composto comercial, permitindo uma maior flexibilidade na formulação alimentar. O uso de enzimas proporciona a redução dos custos de fabrico do alimento composto, através da diminuição do uso de ingredientes caros (Bedford, 2003).

Desde a primeira experiência com enzimas alimentares que foi descrita em 1925, a literatura tem sido inundada com milhares de artigos sobre este tópico (Bedford, 2002). A aplicação comercial de enzimas como aditivo tem uma história de menos de 20 anos. Durante este período, a indústria das enzimas alimentares começou a sua existência e passou por várias fases de desenvolvimento. A primeira fase foi a utilização de enzimas para aumentar a digestibilidade dos nutrientes, incidindo principalmente sobre a supressão dos efeitos antinutritivos dos PNA, como arabinoxilanos e β -glucanos, de dietas de frangos baseadas em grãos viscosos como trigo, centeio, cevada ou tritcale. Durante o início da década de 90, o âmbito de aplicação das enzimas expandiu-se para considerar outros nutrientes para além dos PNA, e outros benefícios acessórios. A fitase é um excelente exemplo, onde não só foi utilizada para aumentar a utilização do fitato, mas também para aliviar as cargas ambientais, reduzindo a excreção de fósforo nos dejectos (Choct, 2006). De salientar que para uso comercial, as enzimas exógenas devem ser capazes de sobreviver aos rigores da transformação alimentar (temperatura, pressão e humidade), e o inóspito ambiente do aparelho digestivo. Não só estas enzimas têm que sobreviver a flutuações de pH e ataque proteolítico de enzimas digestivas, mas também têm de funcionar nestas condições e com uma taxa significativa, a fim de realizar a digestão do substrato (Bedford, 1995). À medida que o alimento passa através do proventrículo/moela, é largamente esterilizado pelos extremos de pH e actividade de pepsina. Subsequentemente, à medida que entra no duodeno, o alimento é exposto a uma rápida e significativa mudança de pH para neutro, que provoca stress a qualquer bactéria que sobreviva ao trânsito gástrico. Influxos grandes de enzimas digestivas, ácidos biliares, lecitina e lisozima constituem um teste de sobrevivência às bactérias tal que, o duodeno é largamente isento de bactérias. Nas regiões superiores do intestino, a eficiência digestiva é máxima devido às elevadas concentrações de enzimas pancreáticas e elevada capacidade e eficiência de absorção dos enterócitos. À medida que o alimento passa através do ID, existe um declínio progressivo nas enzimas digestivas e concentração dos ácidos biliares, como também ao mesmo tempo estes vão sendo catabolisados e/ou absorvidos. Como resultado, o ambiente do ID torna-se cada vez mais hospitaleiro para a colonização bacteriana (Bedford, 2000) que, no caso de animais alimentados com cereais ricos em PNA, pode tirar proveito da viscosidade encontrada, diminuindo-a.

Uma área que tem recebido pouca atenção é o uso de combinações de enzimas, como carbohidrases, proteases, e fitases para melhorar a retenção de nutrientes, e o desempenho no crescimento dos frangos. A lógica sugere que, se a utilização de uma enzima pode melhorar o ganho de peso corporal e a taxa de conversão alimentar de

frangos, comparando com aves que foram alimentadas com uma dieta que não continha nenhuma enzima, o uso de duas ou mais enzimas pode melhorar o alcance e a consistência da resposta. Claramente, esta variedade de respostas às enzimas e combinações de enzimas, torna difícil a escolha para os produtores de produtos avícolas (Cowieson e Adeola, 2005).

O uso de enzimas em alimentação de aves irá continuar a aumentar em popularidade. As considerações práticas que se devem fazer ao escolher uma preparação enzimática comercial para utilização em alimentação de aves são: 1) Identificar o substrato que está a causar o problema que potencialmente pode ser melhorado, e utilizar uma preparação enzimática que actua predominantemente para degradar o substrato; 2) Determinar o conteúdo e o valor da preparação enzimática. Nem todos estes preparados são semelhantes, porque eles variam em concentração e fonte de enzimas; 3) Determinar a segurança e as características de manipulação dos preparados enzimáticos. As enzimas podem ser adquiridas no estado líquido, pó, ou formas encapsuladas; 4) Determinar a estabilidade da enzima durante o armazenamento, fabrico, e digestão (Ferket, 1993).

2.2.2 – Efeito das enzimas alimentares no tracto digestivo

Os órgãos digestivos têm uma habilidade inerente a mudar as suas características morfológicas, fisiológicas e/ou bioquímicas, em resposta a uma variação de estímulos. Dietas baseadas em grãos viscosos como o centeio resultam num aumento do tamanho relativo do TD (Figura 11) (Olkowski *et al.*, 2005).

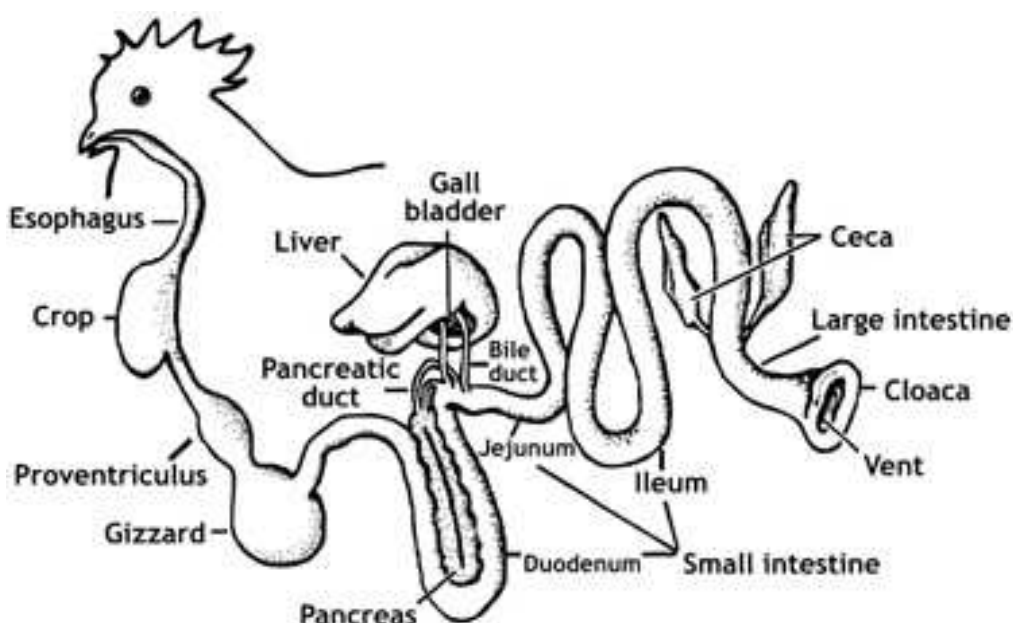


Figura 11: Imagem representativa do tracto digestivo das aves.

(<http://pubs.caes.uga.educaespubspubcdB1187-3.jpg>)

O alargamento do TD em aves pode ser explicado como um mecanismo de adaptação de fundo evolutivo. Ao longo da evolução, um importante componente da dieta natural dos ancestrais dos frangos de hoje em dia, consistia em sementes que continham níveis elevados de material pouco digestível, como os PNA, e insuficientes níveis de nutrientes essenciais. Considerando isto, é razoável especular que os frangos podem ter desenvolvido mecanismos adaptativos os quais aumentam o tamanho dos intestinos, o que eleva a sua capacidade de absorção numa tentativa de extrair o máximo benefício nutritivo de uma dieta de má qualidade. Notavelmente, alguns autores constataram que a elevada viscosidade é a causa da diminuição da digestibilidade dos nutrientes, enquanto outros não encontraram diminuição na digestão associada com o aumento da viscosidade do digesta. Estas discrepâncias nos estudos podem ser atribuídas às diferenças nas respostas adaptativas da ave hospedeira sobre diferentes condições alimentares (Olkowski *et al.*, 2005).

A capacidade do sistema digestivo adaptar-se a diferentes stresses é bem documentada, porém não totalmente compreendida. É evidente que o pâncreas, a fonte primária de enzimas do lúmen intestinal, não é estático no seu output, uma vez que pode alterar a quantidade libertada das enzimas em termos relativos e absolutos num curto prazo (2h), e médio a longo prazo, baseado em resposta a mudanças na dieta, ou simplesmente

como uma função do envelhecimento do animal. Do mesmo modo, o intestino responde em termos de comprimento, peso, área de absorção, e taxa de rotatividade dos enterócitos em resposta a mudanças na dieta (Bedford, 1996a).

O desenvolvimento do TD após a eclosão tem sido amplamente investigado. Todos estes estudos salientam o importante papel do padrão de crescimento do TD durante as primeiras semanas de vida, num período em que os órgãos digestivos aumentam de tamanho mais rapidamente do que o corpo remanescente pois, a ingestão de nutrientes estimula o desenvolvimento do TD nos pintos. A síntese de algumas enzimas pancreáticas é no entanto limitada durante os primeiros dias após o nascimento, o que pode impedir o crescimento precoce (Gracia *et al.*, 2003a). O TD é potencialmente imaturo após a eclosão do pinto, particularmente em relação à digestão de gordura. Várias semanas de maturação são obrigatórias antes da dimensão relativa do ID e o output do pâncreas chegarem a um nível que não vá limitar a taxa de crescimento (Bedford, 1996a).

Quando as quantidades de polissacáridos solúveis são relativamente baixas, como em alguns trigos, os animais podem adaptar-se ao ligeiro aumento na viscosidade do digesta, com um aumento da secreção de enzimas digestivas. Nesta situação, o principal efeito da xilanase será visível somente em fases posteriores do crescimento, como consequência da melhoria do rendimento das fermentações microbianas nas populações do ceco (Fontes *et al.*, 2004). No caso do centeio, à medida que a viscosidade aumenta, a ave adapta-se à deficiência da capacidade digestiva, pelo aumento do output das enzimas pancreáticas, e aumento da área abrangente pelas vilosidades/peso do intestino. Aumentando assim, a utilização de energia no processo digestivo e perdas endógenas que contam para a redução do desempenho das aves. Com viscosidade excessivamente elevada, a ave deixa de ter capacidades adaptativas, então os nutrientes passam através do ID sem serem digeridos (Bedford, 1996a).

O crescimento alométrico dos órgãos do aparelho digestivo varia com a idade das aves (Gracia *et al.*, 2003b), e é aplicável ao sistema digestivo como é com qualquer órgão (Bedford, 1996a). O pâncreas e o ID, na percentagem de peso corporal, aumentam gradualmente a partir dos 0 aos 8 dias, e em seguida, diminuem com a idade. O peso do proventrículo, moela e fígado, aumenta dos 0 aos 4 dias, e em seguida, diminui progressivamente. Indica-se que o peso máximo relativo ocorre antes dos 6 dias. Além disso, a altura e a superfície das vilosidades aumenta com a idade das aves, e a área da superfície de absorção não chega a uma estrutura madura até cerca dos 20 a 30 dias de idade (Gracia *et al.*, 2003b). Vários autores têm investigado as mudanças na relação tamanho e/ou output do ID, o pâncreas, e outras secções do TD, com o envelhecimento

(Bedford, 1996a). Estudos publicados indicam que a maior parte das alterações na morfologia intestinal, crescimento e enzimas digestivas ocorrem durante as 2 primeiras semanas após a eclosão (Batal e Parsons, 2002).

A densidade nutritiva é conhecida pela influência tanto na produção pancreática como no tamanho do intestino. A utilização de uma dieta de alta em oposição a uma de baixa densidade nutritiva (no qual tanto energia e proteína/aminoácidos específicos foram modulados em acordo), resultou numa redução de 16% no tamanho do TD (Bedford, 1996a). A redução da viscosidade intestinal pelo uso de enzimas exógenas demonstrou reduzir o peso e comprimentos relativos do TD da ave, em 20% (Fuente *et al.*, 1998).

Um aumento significativo na fibra alimentar causa grandes aumentos no TD das aves. Alterações na parte superior do tracto podem estar relacionadas com um aumento do desenvolvimento muscular para fazer face a níveis mais elevados de materiais não digestíveis. Aumentos na parte inferior poderiam ter sido causados por um aumento da espessura muscular para ajudar na expulsão de excretas volumosos, e aumento da actividade microbiana para estimular o crescimento intestinal (Brenes *et al.*, 2002).

A melhoria da eficiência digestiva não pode ser atribuída apenas a mudanças morfológicas no TD. Na verdade, o processo digestivo é altamente dependente da actividade das enzimas endógenas (Pinheiro *et al.*, 2004). Além disso, demonstrou-se que as aves criadas com dietas contendo enzimas têm frequentemente diferentes morfologias ao nível do TD, diferentes produções de enzimas pancreáticas, e também diferentes populações microbianas residentes no TD, em comparação com as aves criadas com dietas sem enzimas (Cowieson *et al.*, 2006). O órgão onde se dá a maioria da absorção de nutrientes alimentares nos monogástricos é o ID. Esta parte do tracto está especialmente adaptada para a absorção devido à sua área superficial inerente estar aumentada por dobras e pela presença de vilosidades (McDonald *et al.*, 2002). Em geral, a SE reduz o peso dos órgãos digestivos e aumenta a altura das criptas, e a profundidade das vilosidades no ID (Gracia *et al.*, 2003b).

Segundo Bedford (1996a), as dietas alimentares baseadas em grãos viscosos resultam em aumentos significativos no peso relativo do aparelho digestivo. Reduções na viscosidade intestinal através da utilização de enzimas exógenas relevantes, mostrou reduzir os pesos relativos e comprimento do papo, moela, proventrículo, duodeno, jejuno, e Íleo. Jaroni *et al.* (1999) sugere que o peso do pâncreas, em termos de percentagem do peso corporal, é aumentado na presença de fibras solúveis, o que implica que os mecanismos de feedback no intestino das aves estimulam a hipertrofia deste órgão. Segundo Sieo *et al.* (2005), o aumento do tamanho do pâncreas pode estar relacionado com

um aumento da actividade das enzimas endógenas e volume de secreção necessário para digerir a dieta viscosa.

Lázaro *et al.* (2004) diz que, comparando com o milho, a alimentação com centeio aumenta o comprimento do ID, provavelmente por causa do tempo de passagem do digesta, produzido pelo aumento da viscosidade intestinal. A diminuição da viscosidade pode ser responsável pelo encurtamento observado do jejuno. Relata também que a SE reduz o tamanho do ID de frangos alimentados com dietas à base de centeio. No que se refere ao tamanho dos órgãos, Boros *et al.* (2002) refere que, a SE afecta apenas o peso da moela e o comprimento do íleo, e em ambos os casos os valores diminuem. Comparado com alimentação à base de milho, o centeio com ou sem SE, prejudica o crescimento e a conversão alimentar, dos 4 aos 46 dias, a viscosidade do conteúdo do jejuno, o comprimento do jejuno, e aumenta a incidência de problemas de patas. Já Sayyazadeh *et al.* (2006), diz que as enzimas alimentares não têm qualquer efeito no peso da moela ou do fígado mas têm significativa influência no peso, mas não no comprimento, do intestino. Concluimos que o centeio na alimentação prejudica o desempenho dos frangos, aumenta a viscosidade do digesta, a incidência de problemas de patas, e que a SE reduz a magnitude do problema (Lázaro *et al.*, 2004).

Nos animais monogástricos, a actividade microbiana ocorre maioritariamente no intestino grosso, apesar de existir nas aves um nível baixo de actividade no papo (McDonald *et al.*, 2002). Tem sido demonstrado que a adição de centeio à dieta dos frangos faz aumentar o número de *Clostridium perfringens* no conteúdo cecal (Craven, 2000). O *Clostridium perfringens* é reconhecido mundialmente como um agente patogénico entérico no homem, e nos animais domésticos e selvagens. A enterite necrótica, uma doença das aves causada por este organismo, leva ao desenvolvimento de lesões necróticas na parede do tubo digestivo, levando também ao aumento da mortalidade (Craven, 2000).

Podemos verificar que é necessária mais investigação sobre os efeitos dos PNA sobre a integridade da mucosa intestinal das aves. Essas informações podem ajudar no desenvolvimento da pecuária, e estratégias de gestão para reduzir os seus efeitos (Iji, 1999).

3 – **OBJECTIVOS:**

Ao longo da revisão bibliográfica pudemos verificar quais os problemas da utilização de centeio em frangos de carne, e como os podemos minimizar. O que se pretende estudar no presente trabalho são várias componentes com o objectivo comum, de contribuir para uma melhor caracterização do efeito da SE de dietas à base de centeio, em diferentes períodos do ciclo produtivo de frangos de carne, ao nível das performances produtivas.

Sugere-se que enquanto os preços dos cereais alternativos decrescem, em valor relativo, aos preços dos cereais comuns como milho e trigo, mais despesas para a SE poderão justificar-se, para levar a rentabilidade final mais próxima ou equivalente ao lucro que obteria através da utilização dos cereais comuns (Zhang *et al.*, 2001). Logo, o uso de enzimas proporciona a redução dos custos de fabrico do alimento composto através da diminuição do uso de ingredientes caros (Bedford, 2003).

Para a indústria avícola, a SE é de grande interesse porque não só melhora significativamente a utilização dos nutrientes, mas também leva a uma performance mais consistente e uniforme (Wang *et al.*, 2005). Para o produtor alimentar, a utilização de enzimas oferece benefícios económicos tendo a possibilidade de incluir novos cereais que contenham elevados níveis de PNA, sem limites quantitativos de melhorar o valor nutritivo dos cereais, e de aumentar a flexibilidade na escolha de matérias-primas (Williams *et al.*, 1997).

Os efeitos da viscosidade do digesta no desempenho animal só podem ser visíveis quando a alimentação animal contém moderados a elevados níveis de polissacáridos solúveis, como em dietas à base de centeio (Fontes *et al.*, 2004). As enzimas melhoram o desempenho dos frangos alimentados com centeio em todas as idades (Lázaro *et al.*, 2004) mas, as diferenças de desempenho entre os animais suplementados e não-suplementados podem desaparecer, em 14 dias (Fontes *et al.*, 2004).

Batal e Parsons (2002) sugerem que por volta dos 14 dias de idade, as aves estão aptas para utilizar eficientemente a energia da dieta. Refere também que, estudos publicados indicam que a maior parte das alterações na morfologia intestinal, crescimento e enzimas digestivas ocorrem durante as duas primeiras semanas após a eclosão e que, a adição de enzimas afecta todos os parâmetros num maior grau entre a primeira e a terceira semanas do período de alimentação. A baixa utilidade energética da dieta nos primeiros 4 a 7 dias pós eclosão pode ser atribuída ao baixo desenvolvimento da actividade das enzimas digestivas, e ao funcionamento gastrointestinal. Respostas diferentes devido à idade podem ser devido a uma baixa capacidade do intestino, sistema enzimático endógeno imaturo, ou

população de microrganismos imatura no intestino (Scott e Boldaji, 1997). Também Nahas e Lefrançois (2001) afirmam que, durante as primeiras semanas após a eclosão, o sistema digestivo dos frangos sofre alterações e torna-se mais capaz de digerir eficientemente muitos dos ingredientes incluídos na dieta, é por isso que as enzimas são mais eficientes durante os primeiros 21 dias. Estudos demonstraram ainda que os efeitos negativos do canteio podem ser superados quer por adaptação dos pintos à dieta, ou um aumento da sua idade e/ou o desenvolvimento e maturação do sistema digestivo (Boros *et al.*, 2002).

Assim, o presente estudo, partindo de toda esta informação como base, tentou analisar o impacto de restringir a SE de dietas à base de canteio com xilanases, a períodos específicos do ciclo produtivo de frangos de carne. Isto traria a confirmação de que a SE durante todo o ciclo seria um custo adicional dispensável.

4 – MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 – Local do ensaio e animais utilizados

O ensaio foi conduzido em Junho/Julho de 2008, nas instalações do Instituto Superior de Agronomia (secção de Produção Animal) numa sala equipada com sistema de ventilação, ar condicionado, sistema de distribuição de água para os bebedouros, e com todo o material de apoio à pesagem dos pintos e do alimento composto, e de limpeza da sala.

A sala contém 40 gaiolas, cada uma com área de 2750 cm² (688 cm²/ ave), um comedouro (8,5 cm²/ave), e dois bebedouros de pipeta por gaiola. Por cada duas gaiolas existe uma lâmpada de aquecimento localizado.

Foram utilizados 160 pintos do dia, machos, da estirpe Ross 308.

4.2 – O alimento composto e tratamentos

Antes do início do ensaio foi feita a formulação do alimento base a ser utilizado, tendo em consideração as necessidades nutricionais do animalⁱⁱⁱ, de modo a satisfazer os requisitos de saúde e bem-estar das aves (quadro 4 e 5).

Quadro 4: Composição base do alimento composto.

| Ingredientes | % |
|--------------------------------|-------|
| Centeio | 60,00 |
| Bagaço de Soja (48% PB) | 32,00 |
| Óleo de Soja | 4,00 |
| Sal | 0,30 |
| Carbonato de Cálcio | 2,24 |
| Fosfato Bicálcico | 1,06 |
| DL- Metionina | 0,20 |
| Premix¹ | 0,10 |
| Enzima | 0,10 |

¹ - Premix (suplemento vitamínico e mineral). Fornece o seguinte, por kg de alimento composto: Biotina, 0,5mg; Pantotenato de Cálcio, 10mg; Colecalciferol, 0,05mg; Cianocobalamina, 0,12mg; Ácido Fólico, 0,5mg; Menadiona, 2mg; Ácido Nicotínico, 30mg; Piridoxina, 1,7mg; Retinol, 2,7mg; Tiamina, 1mg; α-Tocoferol, 20mg; Riboflavina, 4,2mg; Cobalto, 0,2mg; Cobre, 10mg; Ferro, 80mg; Iodo, 1mg; Manganésio, 100mg; Selénio, 0,3mg; Zinco, 80mg.

ⁱⁱⁱ - Valores retirados do manual de especificações nutricionais da Ross.

Quadro 5: Composição química/nutricional do alimento composto.

| Cálculo do valor nutritivo: | |
|------------------------------------|------|
| EM (kcal/kg)¹ | 2939 |
| PB (%) | 23 |
| Met (%) | 0,52 |
| Lys (%) | 1,21 |
| AAS (%)² | 0,87 |
| Ca (%) | 0,91 |
| P (%) | 0,4 |

⁽¹⁾ Energia Metabolizável ; ⁽²⁾ Aminoácidos sulfurados (Metionina + Cistina);

No processo utilizado para o fabrico do alimento, o centeio e o bagaço de soja foram moídos, doseados, e colocados no misturador. Separadamente preparou-se uma mistura com os restantes ingredientes, a qual foi adicionada ao centeio e bagaço de soja. Procedeu-se à mistura de todos os ingredientes durante 7 minutos, e seguidamente esta foi granulada e arrefecida. O alimento composto foi então armazenado em caixas até à sua utilização.

As aves foram submetidas a cinco tratamentos diferentes ao longo de quatro semanas (R0, R0-1, R0-2, R0-3 e R0-4), que consistiram na SE do alimento à base de centeio com xilanase, durante diferentes períodos de tempo. O tratamento R0 (controlo negativo), baseou-se no fornecimento de alimento composto à base de centeio sem SE durante todo o ensaio, no tratamento R0-1 foi fornecido alimento composto com enzima apenas na primeira semana de ensaio, o R0-2 é o tratamento em que houve fornecimento de alimento composto com enzima nas primeiras duas semanas de ensaio, no R0-3 houve fornecimento de alimento composto com enzima nas primeiras três semanas de ensaio, e no tratamento R0-4 houve fornecimento de alimento composto com SE nas quatro semanas de ensaio (Figura 12).

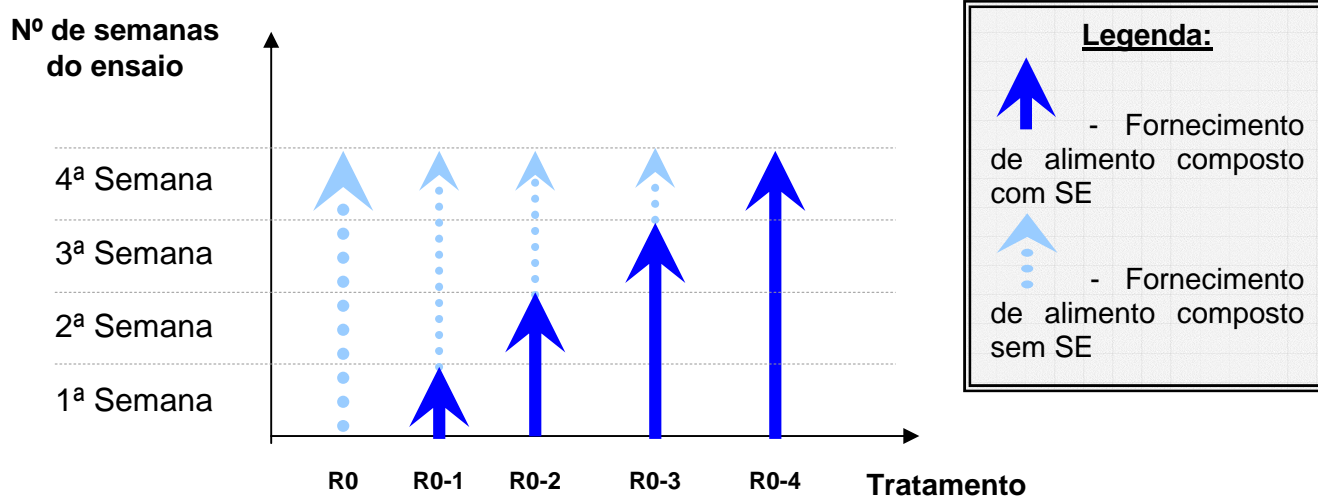


Figura 12: Esquema representativo do procedimento efectuado durante o ensaio.

Para o alimento composto com SE, a adição da enzima ao alimento composto base foi efectuada após o fabrico desta, de modo a que a enzima não sofresse alterações com o processo de granulação. Quando houvesse necessidade de adicionar alimento às aves com SE, a enzima era adicionada ao alimento composto base numa misturadora durante 5 minutos. Nos restantes tratamentos era adicionado excipiente^{iv} para completar o total da formulação, utilizando o mesmo procedimento.

A enzima utilizada tem por nome REAZYME 0.1 (Endo – 1,4 – β – Xylanase), de utilização a nível da alimentação animal, e tendo como destino os frangos de engorda, perus, leitões e suínos em engorda.

A REAZYME 0.1 é uma pentosanase específica do tipo xilanase, utilizada na alimentação animal, para melhorar a digestibilidade dos alimentos ricos em arabinoxilanos, tais como os alimentos com elevada incorporação de centeio. Foi utilizada na proporção de 1 grama de enzima por quilograma de alimento (segundo especificações do produto), e neste caso era adicionada a 19 gramas de excipiente (centeio moído) por quilograma de alimento, antes de ser misturada com o alimento composto base, de modo a obter uma maior homogeneidade no produto final.

^{iv} - O excipiente consistia em centeio moído.

4.3 – Procedimentos antes, durante e após o ensaio

Antes da chegada dos pintos foi feita a verificação do funcionamento de todos os equipamentos da sala. A sala, as gaiolas, e os comedouros, foram desinfectados, e as linhas de água e a sala, limpas. O aquecimento da sala foi ligado 24h antes da chegada dos animais, de modo a que a temperatura ambiente fosse de 27-28°C, e foram colocadas lâmpadas de infravermelhos (IV) para o aquecimento localizado, de modo a obter 30°C no interior das gaiolas, aquando da chegada dos pintos.

Cada um dos tratamentos teve 8 réplicas e no esquema representado na figura 13, podemos ter uma visão da distribuição das 40 gaiolas na sala, e dos vários tipos de tratamentos utilizados neste ensaio.

| | | | | | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| R0-3 | R0-3 | R0-1 | R0-1 | R0-4 | R0-4 | R0-2 | R0-2 | R0 | R0 | R0-3 | R0-3 |
| R0-4 | R0-4 | R0-2 | R0-2 | R0 | R0 | R0-3 | R0-3 | R0-1 | R0-1 | R0-4 | R0-4 |

| | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|
| R0 | R0 | R0-2 | R0-2 | R0-4 | R0-4 | R0-1 | R0-1 |
| R0-1 | R0-1 | R0-3 | R0-3 | R0 | R0 | R0-2 | R0-2 |

Figura 13: Esquema representativo da sala de ensaio com a distribuição dos diferentes tipos de tratamentos, pelas 40 gaiolas existentes.

Após a chegada dos pintos do dia, estes foram pesados individualmente para que o perfil dos pesos fosse equivalente em todas as gaiolas. Foram anilhados nas asas, registados os seus pesos e respectivos números, e alojados nas 40 gaiolas (4 por gaiola). Em cada tratamento utilizamos 32 aves, distribuídas por 8 gaiolas. O alimento e a água foram distribuídos *ad libitum*.

O alimento foi pesado e adicionado a todas as gaiolas sempre que necessário. O estado geral das aves, a altura dos bebedouros e comedouros, e as condições ambientais da sala^v, foram controlados diariamente. Grande acumulação ou dispersão dos pintos indicava-nos que a temperatura não era a correcta. A temperatura da sala foi progressivamente diminuída, e a partir da 3ª semana foi mantida estável a cerca de 21-23°C até ao final do ensaio. Na 4ª semana, as lâmpadas de IV de aquecimento localizado das gaiolas, foram substituídas por lâmpadas normais, para facilitar o controlo das temperaturas

^v - Todos os procedimentos e controlo ambiental tiveram como base as considerações referidas no manual da estirpe.

da sala e das gaiolas. A ventilação da sala também foi regulada sempre que fosse necessário controlar a humidade da sala.

Foi feita semanalmente a pesagem de todas as aves, a pesagem e eliminação do refugo de alimento de todas as gaiolas, e a limpeza da sala.

Ao final das 4 semanas do ensaio (28 dias), 8 aves de cada tratamento, uma por gaiola, foram abatidas. O procedimento utilizado após os 28 dias de ensaio, foi a morte por injeção letal (0,2g de Tiopental^{vi}). Seguidamente foi feita a dissecação das aves, e o isolamento dos seguintes órgãos – papo, moela, fígado, duodeno, jejuno, íleo e cegos. Seguiu-se a recolha do conteúdo/digesta dos órgãos referidos (excepto o fígado), a lavagem dos órgãos do TD, pesagem do papo, moela e fígado, e medição do comprimento do duodeno, jejuno, íleo e cegos.

Os parâmetros registados e calculados ao longo do ensaio foram a quantidade ingerida de alimento, o peso e aumento de peso das aves, e o índice de conversão. A actividade enzimática da xilanase, o comprimento (duodeno, jejuno, íleo e cegos) ou peso (papo, moela, fígado) dos compartimentos do TD, e a viscosidade do digesta (duodeno+jejuno, e íleo), foram também analisados.

4.4 – Análises efectuadas ao digesta:

4.4.1 – Análise de viscosidade

Após a recolha do conteúdo do duodeno+jejuno e íleo, parte deste foi para fins de cálculo da viscosidade. Efectuou-se a centrifugação das diversas amostras dos conteúdos dos compartimentos gastrointestinais durante 10 minutos a 9000rpm, e os sobrenadantes foram utilizados para medir as viscosidades, no viscosímetro *Brookfield cone and plate LVCDVII*, a 6rpm.

Devido à elevada viscosidade das amostras que, era superior ao limite máximo do viscosímetro (50cpo), estas foram diluídas em água (500µl de água por 500µl de amostra centrifugada).

^{vi} - O tiopental (C₁₁H₁₇N₂O₂SN_a) é um barbitúrico de acção rápida, utilizado frequentemente em anestesia, cujo nome oficial é Tionembutal sódico. Quando utilizado em certa dosagem, leva à morte das aves.

4.4.2 – Análise da actividade enzimática

A actividade enzimática foi determinada segundo o método descrito por Fontes *et al.*, (2000). O procedimento para análise qualitativa da actividade enzimática das amostras do digesta foi feito através da elaboração de placas de ágar (2%) com, xilano solúvel (0,1%) em 10mM Tris-HCl (pH=8).

As amostras dos conteúdos gastrointestinais foram centrifugadas a 13000rpm durante 5 minutos, e retirado o sobrenadante. Nas placas de ágar foram feitos buracos com pipetas de Pasteur, e colocado em cada um deles cerca de 20µl de cada amostra do digesta. As placas foram incubadas cerca de 20-24 horas numa estufa a 37°C. Depois da incubação as placas foram coradas com vermelho do Congo a 1% durante 15-20 minutos, e descoradas com 1M NaCl (pH=8) durante 15-20 minutos. As placas foram colocadas sobre uma placa de luz para um registo fotográfico. Este serviu para elaborar uma tabela com os resultados, tendo por base os halos formados à volta dos buracos feitos nas placas, onde se tinham colocado as amostras, devidamente identificadas, dos conteúdos intestinais.

4.5 – Análise estatística

A análise estatística dos parâmetros estudados foi efectuada usando o método de análise de variância (SAS, 1991).

Foram comparadas as médias através do teste de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.6 – Análise intestinal

A análise aos intestinos e seu conteúdo não faziam parte do protocolo inicial deste ensaio mas, tornou-se pertinente a sua realização pois, durante o processo de abate foram encontradas algumas aves com hemorragias nos intestinos, e por conseguinte, sangue nas fezes. Por se ter suspeitado que pudessem ser sintomas de coccidiose, dois animais foram enviados para análise. Esta foi efectuada pelo laboratório de Anatomia Patológica, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, sendo desconhecido o procedimento utilizado para tal análise.

5 – **RESULTADOS:**

5.1 - **Parâmetros zootécnicos**

A tabela 1 apresenta os dados da quantidade ingerida (semanal e total), peso, aumento de peso (semanal e total), e índice de conversão (semanal e total), por ave. Podemos observar os valores médios das quatro semanas de ensaio, organizados conforme o tipo de tratamento (R0, R0-1, R0-2, R0-3 e R0-4).

Os resultados mostram que ao longo das 4 semanas de ensaio, a quantidade ingerida só foi significativamente diferente entre tratamentos, na primeira e quarta semanas. Na primeira semana os tratamentos com SE (R0-1, R0-2, R0-3 e R0-4) obtiveram valores que não diferiram entre si ($p > 0,05$), e R0-3 foi mais alto que R0. Enquanto isso, na quarta semana os tratamentos R0-1, R0-2, R0-3 e R0-4, obtiveram valores não significativamente diferentes de R0 ($p > 0,05$), o mesmo acontecendo com a quantidade ingerida total.

Ao nível do peso podemos verificar que, no primeiro dia de ensaio (d0) os valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Na primeira semana (d7) não se encontram diferenças significativas entre os tratamentos com SE. Na segunda semana (d14), os tratamentos R0-2, R0-3 e R0-4 não são significativamente diferentes. Também podemos verificar que nas duas primeiras semanas, R0-2, R0-3 e R0-4 são maiores que R0. Na terceira semana (d21), R0-3 e R0-4 não diferem entre si, e são mais altos que R0. Na última semana de ensaio (d28), o peso das aves dos tratamentos R0-2, R0-3 e R0-4 não foram significativamente diferentes, e R0-3 e R0-4 foram superiores a R0.

Relativamente ao aumento de peso semanal, na 1ª semana de ensaio, os tratamentos com SE não diferiram significativamente entre si, e tiveram performances superiores às do controlo negativo. Na 2ª, 3ª e 4ª semanas, os tratamentos R0-2, R0-3 e R0-4, não diferiram significativamente, o mesmo acontecendo no caso do aumento de peso total.

Observou-se que na primeira semana os animais relativos aos tratamentos com SE obtiveram índices de conversão que não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$), e na segunda semana os tratamentos R0-2, R0-3 e R0-4 tiveram resultados não significativamente diferentes mas, apenas R0-4 é menor que R0. Não se registaram diferenças significativas entre os índices de conversão de todos os tratamentos, na terceira e quarta semanas de ensaio. Analisando os índices de conversão totais, os tratamentos R0-2, R0-3 e R0-4 não diferem significativamente, além disso R0-2 e R0-4 são inferiores a R0.

Tabela 1 – Média dos parâmetros zootécnicos avaliados em frangos cujo alimento composto à base de centeio continha ou não suplementação de xilanases.

| Parâmetros | | R0 ¹ | R 0-1 ¹ | R 0-2 ¹ | R 0-3 ¹ | R 0-4 ¹ |
|---------------------------------|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Quantidade ingerida (g) | 1ª Semana | 127,5 ^b | 139,1 ^{ab} | 132,6 ^{ab} | 143,4 ^a | 137,4 ^{ab} |
| | 2ª Semana | 352,2 | 357,2 | 354,8 | 357,5 | 359,0 |
| | 3ª Semana | 586,1 | 580,9 | 582,4 | 588,6 | 585,6 |
| | 4ª Semana | 771,9 ^{ab} | 770,4 ^{ab} | 738,2 ^b | 805,7 ^a | 796,1 ^a |
| Quantidade ingerida total (g) | | 1812,8 ^{ab} | 1847,6 ^{ab} | 1733,6 ^b | 1869,1 ^a | 1798,7 ^{ab} |
| Peso (g) | d 0 | 46,2 | 46,0 | 46,3 | 46,2 | 46,1 |
| | d 7 | 134,3 ^b | 140,5 ^{ab} | 143,9 ^a | 147,4 ^a | 145,0 ^a |
| | d 14 | 333,5 ^c | 350,9 ^{bc} | 365,5 ^{ab} | 364,6 ^{ab} | 373,7 ^a |
| | d 21 | 651,6 ^b | 664,5 ^{ab} | 685,9 ^{ab} | 704,5 ^a | 700,9 ^a |
| | d 28 | 918,8 ^c | 946,4 ^{bc} | 978,6 ^{abc} | 1001,6 ^{ab} | 1032,7 ^a |
| Aumento de peso (g) | 1ª Semana | 88,1 ^b | 94,5 ^{ab} | 97,6 ^a | 101,2 ^a | 98,9 ^{ab} |
| | 2ª Semana | 201,3 ^c | 209,9 ^{bc} | 218,9 ^{ab} | 216,7 ^{abc} | 228,1 ^a |
| | 3ª Semana | 315,6 ^{ab} | 312,5 ^b | 320,4 ^{ab} | 339,9 ^a | 325,1 ^{ab} |
| | 4ª Semana | 269,9 ^b | 281,8 ^b | 297,9 ^{ab} | 296,8 ^{ab} | 325,9 ^a |
| Aumento de peso total (g) | | 872,6 ^c | 900,4 ^{bc} | 932,4 ^{abc} | 955,5 ^{ab} | 986,4 ^a |
| Índice de conversão (g/g) | 1ª Semana | 1,53 ^a | 1,50 ^{ab} | 1,38 ^b | 1,44 ^{ab} | 1,42 ^{ab} |
| | 2ª Semana | 1,79 ^a | 1,75 ^a | 1,65 ^{ab} | 1,68 ^{ab} | 1,60 ^b |
| | 3ª Semana | 1,90 | 1,95 | 1,85 | 1,77 | 1,83 |
| | 4ª Semana | 3,13 | 3,14 | 2,58 | 2,85 | 2,52 |
| Índice de conversão total (g/g) | | 2,10 ^a | 2,07 ^a | 1,87 ^b | 1,93 ^{ab} | 1,83 ^b |

⁽¹⁾ **R0** = fornecimento de alimento composto sem enzima durante as 4 semanas de ensaio; **R0-1** = fornecimento de alimento composto com enzima apenas na 1ª semana de ensaio; **R0-2** = fornecimento de alimento composto com enzima nas primeiras 2 semanas de ensaio; **R0-3** = fornecimento de alimento composto com enzima nas primeiras 3 semanas de ensaio; **R0-4** = fornecimento de alimento composto com enzima durante as 4 semanas de ensaio.

^{a,c} – As médias na mesma linha que não partilham uma letra comum diferem significativamente ($p < 0,05$).

A tabela 2 apresenta a mortalidade verificada ao longo do ensaio. Não existem evidências que mostrassem que a mortalidade teria alguma relação com o tipo de tratamento.

Os dados foram convertidos a percentagens para mais fácil percepção e análise. No final da tabela consta o valor aproximado da mortalidade total, observada durante as quatro semanas.

Tabela 2 – Mortalidade (%) ao longo do ensaio.

| Tempo de duração do ensaio | Mortalidade (%) |
|-----------------------------------|------------------------|
| 1 ^a semana | 1,25% |
| 2 ^a semana | 1,27% |
| 3 ^a semana | 0% |
| 4 ^a semana | 2,56% |
| Total | ≅ 5% |

5.2 – Pesos e comprimentos dos compartimentos gastrointestinais

A tabela 3 mostra-nos alguns dos parâmetros que foram registados e analisados, após o abate das aves. O peso do papo, moela e fígado, e o comprimento de compartimentos gastrointestinais como o duodeno, jejuno, íleo e cegos, foram devidamente medidos e registados.

Os valores finais que se encontram na tabela foram calculados posteriormente aos registos efectuados no abate pois, para se poder proceder a uma análise e comparação dos valores entre si, estes têm de ser todos relativos ao peso vivo (PV) das respectivas aves. Após análise estatística destes parâmetros verificamos que o tipo de tratamento não os afectou, visto os valores não serem significativamente diferentes entre tratamentos ($p > 0,05$).

Tabela 3 – Peso e comprimento médios relativos dos compartimentos do tracto digestivo de aves, alimentadas com dietas suplementadas com xilanases.

| Parâmetros | Compartimento | R0 ¹ | R 0-1 ¹ | R 0-2 ¹ | R 0-3 ¹ | R 0-4 ¹ |
|---|---------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Peso do compartimento/ Peso Vivo (g/kg PV) | Papo | 3,52 | 3,69 | 4,00 | 3,64 | 3,68 |
| | Moela | 10,49 | 9,61 | 9,89 | 9,57 | 9,35 |
| | Fígado | 31,94 | 31,65 | 34,52 | 30,70 | 34,60 |
| Comprimento do compartimento/ Peso Vivo do animal (cm/kg PV) | Duodeno | 25,98 | 27,18 | 26,86 | 25,49 | 25,77 |
| | Jejuno | 65,96 | 75,27 | 73,30 | 70,99 | 74,12 |
| | Íleo | 70,68 | 76,37 | 74,05 | 72,33 | 75,12 |
| | Cegos | 15,00 | 14,98 | 15,07 | 14,20 | 14,99 |

⁽¹⁾ **R0** = fornecimento de alimento composto à base de centeio sem adição de enzima durante as 4 semanas de ensaio; **R0-1** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima apenas na 1ª semana de ensaio; **R0-2** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima nas primeiras 2 semanas de ensaio; **R0-3** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima nas primeiras 3 semanas de ensaio; **R0-4** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima durante as 4 semanas de ensaio.

5.3 – Viscosidade do digesta

Os valores obtidos na análise da viscosidade do digesta por leitura no viscosímetro, podem ser observados no gráfico representado na figura 14. Este mostra-nos o nível de viscosidade demonstrado pelos conteúdos dos dois compartimentos intestinais analisados (duodeno+jejuno^{vii}, e íleo), com a variação dos tratamentos.

A viscosidade no compartimento duodeno+jejuno não foi significativamente diferente ($p > 0,05$) nos tratamentos R0-1, R0-2 e R0-4. No íleo a viscosidade de R0-4 e R0 não diferem significativamente ($p > 0,05$).

^{vii} - Foram analisados juntos, visto não se conseguir diferenciar os conteúdos específicos de cada um.

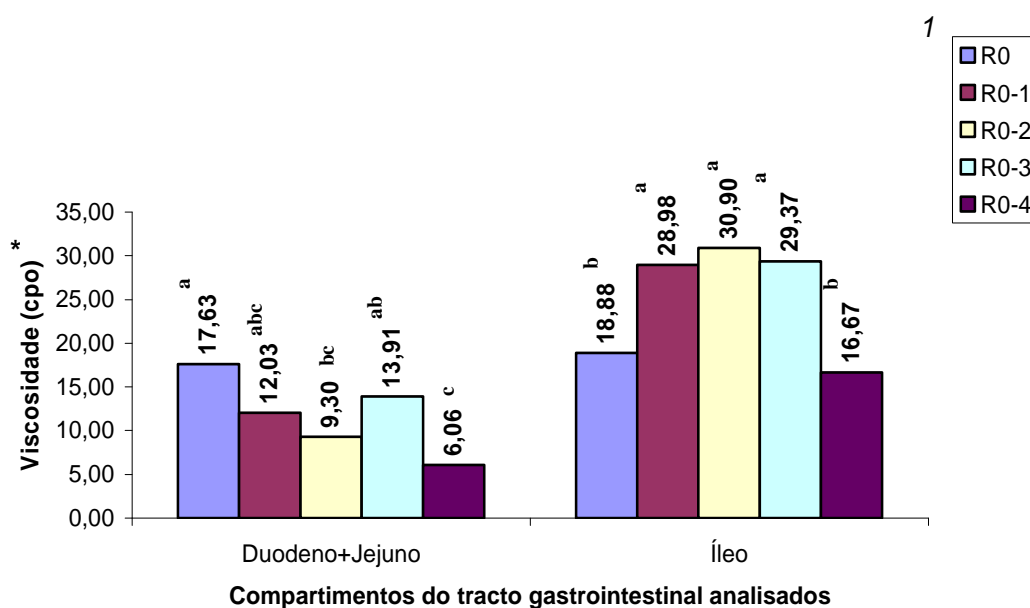


Figura 14: Distribuição das viscosidades médias do conteúdo do duodeno+jejuno e do íleo, conforme o tipo de tratamento.

⁽¹⁾ **R0** = fornecimento de alimento composto à base de centeio sem adição de enzima durante as 4 semanas de ensaio; **R0-1** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima apenas na 1ª semana de ensaio; **R0-2** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima nas primeiras 2 semanas de ensaio; **R0-3** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima nas primeiras 3 semanas de ensaio; **R0-4** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima durante as 4 semanas de ensaio.

^{a,c} – As médias de cada compartimento analisado que não partilham uma letra comum diferem significativamente ($p < 0,05$).

* - Os valores de viscosidade indicados na tabela foram obtidos após uma diluição em água das amostras dos compartimentos (500µl de água por 500µl de amostra centrifugada) pois, as viscosidades reais eram superiores ao limite máximo do viscosímetro.

5.4 – Actividade enzimática

A tabela 4 foi elaborada através dos resultados obtidos pela análise à actividade enzimática, efectuada a amostras de digesta. Foram utilizadas 40 amostras retiradas de compartimentos digestivos dos animais abatidos (8 por cada tratamento).

Após a análise da actividade enzimática ao nível do papo, moela, duodeno, jejuno, íleo e cegos, organizaram-se os dados por tratamentos. Verificou-se que houve sempre actividade enzimática ao nível dos cegos, em todos os tratamentos. Não houve no entanto, uma distribuição de resultados que nos permitisse tirar conclusões sobre a actividade enzimática no resto dos compartimentos.

Tabela 4 – Actividade xilanolítica ao longo dos compartimentos do tracto digestivo de aves alimentadas com dietas suplementadas com xilanases (a classificação do nível da actividade foi feita numa escala qualitativa - Ø ⇒ ausência de amostra de digesta ou amostra insuficiente; 0 ⇒ ausência de actividade enzimática; + a +++ ⇒ pouca a muita actividade enzimática, respectivamente).

| Animal | Tratamento | Papo | Moela | Duodeno | Jejuno | Íleo | Cegos |
|--------|------------|------|-------|---------|--------|------|-------|
| 1 | R0 | 0 | 0 | + | + | +++ | ++ |
| 2 | R0 | 0 | 0 | 0 | +++ | + | + |
| 3 | R0-1 | Ø | Ø | 0 | +++ | 0 | + |
| 4 | R0-1 | + | 0 | 0 | 0 | ++ | ++ |
| 5 | R0-2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 6 | R0-2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 7 | R0-3 | 0 | Ø | + | ++ | 0 | + |
| 8 | R0-3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 9 | R0-4 | + | 0 | 0 | + | 0 | +++ |
| 10 | R0-4 | + | + | 0 | 0 | Ø | ++ |
| 11 | R0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ | + |
| 12 | R0 | ++ | 0 | 0 | 0 | + | Ø |
| 13 | R0-1 | Ø | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 14 | R0-1 | Ø | 0 | 0 | 0 | 0 | +++ |
| 15 | R0-2 | Ø | 0 | + | 0 | 0 | + |
| 16 | R0-2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| 17 | R0-3 | Ø | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 18 | R0-3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 19 | R0-4 | Ø | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 20 | R0-4 | Ø | 0 | 0 | + | 0 | ++ |
| 21 | R0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | ++ |
| 22 | R0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 23 | R0-1 | 0 | 0 | ++ | 0 | ++ | ++ |
| 24 | R0-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ | ++ |
| 25 | R0-2 | Ø | 0 | 0 | 0 | + | +++ |
| 26 | R0-2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 27 | R0-3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 28 | R0-3 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | ++ |
| 29 | R0-4 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | ++ |
| 30 | R0-4 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | +++ |
| 31 | R0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +++ | ++ |
| 32 | R0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Ø | ++ |
| 33 | R0-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 34 | R0-1 | 0 | 0 | 0 | +++ | + | ++ |
| 35 | R0-2 | Ø | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 36 | R0-2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 37 | R0-3 | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | ++ |
| 38 | R0-3 | + | 0 | 0 | ++ | 0 | ++ |
| 39 | R0-4 | Ø | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 40 | R0-4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |

Legenda da tabela 4:

R0 = fornecimento de alimento composto à base de centeio sem adição de enzima durante as 4 semanas de ensaio; **R0-1** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima apenas na 1ª semana de ensaio; **R0-2** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima nas primeiras 2 semanas de ensaio; **R0-3** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima nas primeiras 3 semanas de ensaio; **R0-4** = fornecimento de alimento composto à base de centeio com adição de enzima durante as 4 semanas de ensaio.

5.5 – Coccidiose

Após as análises feitas às amostras intestinais e seu conteúdo, pelo laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Técnica de Lisboa, o resultado foi negativo, para a possível presença de coccidiose nas aves. Não foram encontradas evidências microscópicas nem macroscópicas nas amostras, que pudessem representar indicadores de contaminação por coccídias, ou infecção pelos seus oocistos.

6 - **DISCUSSÃO:**

O centeio, devido aos seus vários inconvenientes na utilização em alimentação de frangos de carne, é um cereal pouco utilizado. No entanto, devido à subida de preços dos cereais tradicionalmente usados, o centeio poderá ser utilizado em zonas do mundo onde este cereal está disponível.

Este trabalho foi elaborado para analisar a SE, em períodos restritos da vida dos frangos, utilizando um alimento composto à base de centeio. Os parâmetros zootécnicos foram analisados, tal como a mortalidade, o peso ou comprimento de alguns dos compartimentos gastrointestinais, a viscosidade do digesta e a actividade enzimática encontrada ao longo destes.

Face aos resultados não se observou qualquer efeito por parte dos tratamentos na quantidade ingerida semanalmente nem na total pois, na maior parte dos casos os tratamentos com SE não diferiram de R0.

Analisando os pesos dos animais no primeiro dia (d0), podemos verificar que estes não foram significativamente diferentes, o que seria de esperar, visto termos feito uma selecção dos pintos para obtermos homogeneidade de pesos nas gaiolas, e no bando. Podemos evidenciar que ao longo do ensaio o tratamento R0-2 obteve valores de pesos estatisticamente não diferentes aos de R0-3 e R0-4, mesmo R0-2 tendo um consumo alimentar menor em cerca de 8% na última semana de ensaio que, por exemplo R0-3.

Quanto ao aumento de peso semanal podemos verificar que na 1ª semana de ensaio, as dietas que continham SE não diferiram significativamente entre si, e foram superiores a R0. Durante o resto do ensaio, o aumento de peso das aves do tratamento R0-2, não foi significativamente diferente de R0-3 e R0-4. Assim, podemos retirar destas evidências que, a SE afectou o aumento de peso, e esse efeito foi mais evidente nas duas primeiras semanas de ensaio. O mesmo se pode dizer dos resultados obtidos para o aumento de peso total pois, R0-2, R0-3 e R0-4, não diferem significativamente entre si, e têm performances superiores a R0 e R0-1.

Depois de analisar os parâmetros relativos ao peso podemos dizer que, com alimento composto à base de centeio, não é necessário SE na terceira e quarta semanas de ensaio. Assim, visto um alimento composto que só levou SE nas primeiras duas semanas ter obtido resultados estatisticamente semelhantes a tratamentos que tiveram adição de enzimas durante três semanas e mesmo durante todo o ensaio, só podemos concluir que a partir da terceira semana do ciclo produtivo de frangos, a SE começa a não afectar significativamente o seu peso. Investigações sobre o desenvolvimento neonatal do sistema

digestivo sugerem que este pode não ter suficiente capacidade enzimática e de absorção para lidar com todos os tipos de dieta. À medida que a ave se desenvolve, a sua produção de enzimas pancreáticas e a superfície abrangida pelas vilosidades aumenta, para lidar com os requisitos digestivos da ave (Bedford, 1996b).

Podemos dizer então que obtivemos valores que estão de acordo com os de Fontes *et al.* (2004) pois, estes referem que as diferenças de desempenho entre os animais suplementados e não-suplementados, podem desaparecer em 14 dias, tal como indicam Batal e Parsons (2002). Porém estes últimos acrescentam que, a adição de enzimas afecta todos os parâmetros num maior grau entre a primeira e a terceira semana do período de alimentação, e Nahas e Lefrançois (2001) também mostram que as enzimas são mais eficientes durante os primeiros 21 dias, o que não sucedeu no nosso caso, pois obtivemos valores na quarta semana, para R0-2, R0-3 e R0-4, que não diferem significativamente. Assim, segundo o presente estudo podemos verificar que as enzimas são mais eficientes durante os primeiros 14 dias, e que a SE melhorou os parâmetros zootécnicos das aves.

Observando outros estudos efectuados, Boros *et al.* (1995) utilizaram alimento composto com cerca de 60% de centeio, suplementado enzimaticamente durante todo o ensaio, tal como temos o caso do tratamento R0-4. Estes autores obtiveram valores de PV na 3ª e 4ª semanas, um pouco superiores aos nossos. Enquanto neste ensaio obtivemos pesos de cerca de 700g na 3ª semana e 1032g na 4ª semana, Boros *et al.* (1995) obtiveram 723g na 3ª, e 1137g na 4ª semana. Tal como Mathlouthi *et al.* (2002) referiram, podemos retirar como aplicação óbvia que, o aumento de peso e o consumo, diferem grandemente entre alimento composto à base de centeio, e o mesmo, com adição de enzimas. Já em Fontes *et al.* (2004) há comparação entre alimento composto à base de trigo e centeio com ou sem adição de enzimas, e mostram a evolução dos pesos das aves ao longo de 4 semanas. Tanto com o trigo como com o centeio, a adição de xilanases fez aumentar o peso ao longo dos 28 dias. Os pesos das aves alimentadas com o alimento composto à base de trigo são sem dúvida superiores pois, possui uma menor percentagem de PNA na sua constituição. No alimento composto à base de centeio, os valores dos pesos das aves obtidos no presente estudo são semelhantes aos obtidos por Fontes *et al.* (2004).

O tratamento não afectou o índice de conversão na terceira e quarta semanas. Só nas duas primeiras semanas se obtiveram valores que diferem significativamente ($p < 0,05$). Na 2ª semana os valores dos tratamentos R0-2, R0-3 e R0-4 não foram significativamente diferentes. Mais uma vez R0-2 obteve valores estatisticamente semelhantes a R0-3 e R0-4. Comparando com valores obtidos por Lázaro *et al.*, (2004) os índices de conversão foram muito semelhantes aos nossos. A inexistência de diferenças significativas nas duas últimas

semanas, podem dever-se a desperdícios de comida, por partes das aves, que possam ter ocorrido e como tal não foram contabilizados. Os índices de conversão totais também nos mostram que os tratamentos R0-2, R0-3 e R0-4 não diferem significativamente, e que R0-2 tem um melhor valor que R0. O que reforça a hipótese de as enzimas afectarem as aves mais eficientemente nos primeiros 14 dias.

Observamos que a taxa de mortalidade total foi cerca de 5%. Como não obtivemos nenhum resultado revelador ao nível da mortalidade por tratamento, a análise dos dados foi feita por cada semana de ensaio. Nas primeiras semanas alguma mortalidade deveu-se a problemas de patas, o que impedia o bem-estar e a capacidade de mobilidade para se alimentarem. Após a eclosão, a fragilidade das aves leva-nos a dizer que, a mortalidade na primeira semana, pode não ter causa explicável. No entanto, podemos ver que houve uma maior incidência de mortes na 4ª semana de ensaio devido possivelmente a variações de temperatura que houve na sala nessa semana, tendo como causa o tempo instável (muito calor durante o dia, e frio durante a noite), o que dificultou a regulação do ar condicionado da sala ou, outro tipo de comportamento característico das aves como lutas e/ou enfartamento (algumas aves apresentavam quantidade excessiva de alimento acumulado no papo). Grandes oscilações de temperatura podem provocar distúrbios no crescimento e podem mesmo levar à morte dos animais mais susceptíveis. Após o abate, verificou-se hemorragias nos intestinos de alguns animais, situação esta que pode ter sido causadora do aumento da mortalidade na 4ª semana. Pôs-se a hipótese de ser um sintoma de coccidiose mas, após análises verificou-se não existir nenhum agente patogénico, o que nos deixou apenas a hipótese de hemorragia natural mas, com tantos casos teria de haver uma causa credível que abrangesse um factor comum. Especulamos que o elevado engrossamento/espessamento dos intestinos com o cienteio possa ter provocado o rompimento de vasos sanguíneos, levando em casos mais extremos à morte dos animais. Não há no entanto nenhuma relação coerente entre o tipo de tratamento e as mortes verificadas, nem entre o tipo de tratamento e os animais encontrados no abate com hemorragias no tracto intestinal. Assim, podemos dizer que este foi um problema que não foi travado pelas enzimas. Em Lázaro *et al.*, (2004), e como verificámos nos nossos resultados, a taxa de mortalidade é mais elevada nas últimas semanas, restando encontrar a explicação para tal.

Os vários tratamentos não afectaram o peso nem o comprimento dos compartimentos gastrointestinais que foram analisados. Segundo vários autores o alimento composto de grãos viscosos, neste caso à base de cienteio, fazem aumentar o tamanho do TD, e a adição de enzimas faz com que esse aumento seja reduzido. Ao contrário das

referências de vários autores, o tratamento que não possuía enzima foi o que teve valores mais baixos. Especula-se que as aves com adição do tratamento R0, quando confrontadas com um ambiente adverso provocado pela viscosidade do digesta, tenham desenvolvido capacidades de o superar, por adaptação, sem a ajuda da adição de enzimas exógenas. Existem, no entanto, alguns autores cujas afirmações se contradizem, talvez porque ainda não se obtiveram resultados completamente conclusivos sobre esta questão. Por exemplo no caso de Sayyazadeh *et al.*, (2006), estes afirmam que as enzimas alimentares não têm qualquer efeito no peso da moela ou do fígado mas, têm significativa influência no peso, e não no comprimento do intestino. Também observaram que o peso do sistema digestivo diminuiu mais de 20% com a adição de enzimas. Enquanto isso, autores como Boros *et al.*, (2002), e Lázaro *et al.*, (2004) referem que, a SE afecta apenas o peso da moela e o comprimento do íleo, e em ambos os casos os valores diminuem (Boros *et al.*, 2002); a SE reduz os pesos relativos de moela ($p < 0,05$) e do papo ($p < 0,01$), e o comprimento do jejuno ($p < 0,05$) (Lázaro *et al.*, 2004). Existem também opiniões intermédias como a de Bedford (1996a) que refere que, dietas alimentares baseadas em grãos viscosos resultam em aumentos significativos no peso relativo do aparelho digestivo. Reduções na viscosidade intestinal através da utilização de enzimas exógenas relevantes, mostram reduzir os pesos relativos e comprimento do papo, moela, proventrículo, duodeno, jejuno e íleo.

Tal como pudemos observar neste ensaio, não obtivemos resultados significativamente diferentes entre os vários tratamentos, por isso não podemos afirmar que a adição de enzima diminui o tamanho do duodeno, jejuno, íleo e cegos nem, o peso do papo, moela e fígado. Mas, como não registamos os pesos dos vários compartimentos intestinais não poderemos negar que, talvez o que se altere com a adição de enzimas seja o peso dos compartimentos intestinais e não o seu comprimento, o que iria em favor do que foi sugerido por Sayyazadeh *et al.*, (2006). Além disso, as hemorragias verificadas no intestino de algumas aves, podem estar associadas ao espessamento das paredes do intestino, o que sugere que tenha havido aumento de peso e não de comprimento.

Quanto ao tamanho do pâncreas, e apesar de não ter sido registado nem apresentado este parâmetro para estudo, durante o processo de abate foi observado o seu tamanho que, segundo exame visual se verificou estar acima do tamanho normal. O aumento do tamanho do pâncreas pode estar relacionado com um aumento da actividade das enzimas endógenas, e volume de secreção necessário para digerir a dieta muito rica em PNA (Siao *et al.*, 2005).

Em relação às viscosidades do conteúdo do duodeno+jejuno e do íleo, podemos dizer que estes resultados não poderão ser comparáveis aos obtidos em outros trabalhos e

por outros autores, visto os valores reais das viscosidades não terem sido conseguidos pois, estes ultrapassavam o limite superior do viscosímetro utilizado. Teve de ser feita uma diluição igual para todas as amostras de modo a termos pelo menos valores disponíveis para podermos efectuar uma análise dos valores entre si, e entre tratamentos. Inesperadamente, nas viscosidades ileais, os tratamentos R0 e R0-4 obtiveram valores não significativamente diferentes. Isto pode dever-se ao facto de que apesar de as amostras terem sofrido uma diluição igual, de modo a poder-se proceder à sua leitura no viscosímetro, a viscosidade era de tal modo elevada que durante a leitura ocorreu uma elevada oscilação dos valores. O sucedido pode nem sempre ter levado a um registo correcto e preciso dos valores. Podemos pôr essa hipótese no caso da viscosidade ileal dos tratamentos R0 pois, é muito pouco provável que os digestas de aves que nunca consumiram xilanases ao longo do ciclo, terem obtido uma viscosidade semelhante aos digestas dos tratamentos R0-4. Mesmo assim podemos dizer que no geral, a adição enzimática diminuiu a viscosidade do digesta dos conteúdos intestinais.

Em Bedford e Classen (1992), Bedford (1993) e Lázaro *et al.*, (2004) atingiram-se elevados valores de viscosidade do digesta, com alimento composto à base de centeio. Com 60% de incorporação de centeio e sem enzima, o valor da viscosidade pode atingir os 350cpo, e com 60% de centeio e 1% de enzima ainda obtemos um valor de cerca de 100cpo no duodeno+jejuno enquanto que, no íleo os mesmos tratamentos podem chegar a 900 e 600cpo, respectivamente. As dietas à base de centeio têm valores padrão de viscosidades que podem ir de um mínimo de 70cpo, a máximos superiores a 1000cpo. Como termo de comparação temos por exemplo o milho, que tem valores padrão de viscosidades que podem ir de um mínimo de 1,5cpo, a máximos de 4,5cpo, e o trigo de 3cpo como mínimo, a 45cpo como máximo (Bedford, 1996).

Quanto à actividade xilanolítica ao longo dos compartimentos do TD, os resultados apresentados mostram que, nas mesmas condições, tanto os digestas das aves dos tratamentos R0 como os outros, possuem um nível relativo de actividade xilanolítica nos seus conteúdos intestinais. Não se encontra no entanto, nenhum tratamento que se evidencie como tendo maior actividade enzimática. Todos tiveram actividade enzimática ao nível dos cegos talvez devido à população microbiana aí existente, cujas bactérias exerceram a sua actividade enzimática na degradação dos substratos. Além disso, podemos indicar que o único tratamento com actividade enzimática na moela foi o R0-4 mas, tendo-se encontrado apenas num caso isolado, não podemos considerá-lo como genuíno.

O local onde a actividade enzimática se reveste de maior importância é o ID pois, é onde se dá a maior parte da absorção dos nutrientes. As enzimas até alcançarem o

intestino, atravessam um percurso onde estão, por vezes, sujeitas a ambientes extremamente ácidos o que poderá comprometer a sua estrutura proteica. Desta última afirmação, pode vir uma hipótese válida para os resultados obtidos na actividade enzimática, e também pode ter sido parte interveniente em todos os resultados obtidos neste ensaio. Além disso, podemos também acrescentar às flutuações de pH, o ataque proteolítico das enzimas digestivas.

7 – CONCLUSÃO:

Os frangos em crescimento são muito sensíveis ao centeio na alimentação. A fracção solúvel e altamente viscosa dos arabinoxilanos é responsável pelos maiores efeitos antinutritivos do centeio, e a adição de xilanase neutraliza parte destes efeitos. Parece, no entanto, que os efeitos negativos do centeio podem ser superados quer por adaptação do pinto à dieta, ou um aumento da sua idade e/ou o desenvolvimento e maturação do TD. Apesar do facto de tanta informação ter sido publicada no campo de estudo das enzimas usadas nas dietas das aves, é ainda difícil estimar a escala de resposta esperada através da aplicação de uma enzima, numa dieta específica (Bedford, 2002). Muitos outros factores podem afectar a digestibilidade e a performance dos frangos, como seja variações bruscas da temperatura ambiente, humidade, consumo de água e alimento, pH do TD, ruído, entre outros, que também têm de ser tidos em conta na altura da análise final dos dados.

Através deste ensaio podemos dizer que o centeio poderá ser utilizado em último recurso pelos produtores, caso os preços dos cereais como o trigo e o milho continuem a aumentar como até então. A sua utilização pode ser importante em zonas do mundo onde há escassez de oferta dos outros cereais utilizados em alimento composto, como o milho, trigo e cevada, o que pode trazer benefícios para os produtores avícolas na altura de fazer o orçamento para a alimentação dos animais.

Como foi sugerido por Zhang *et al.* (2001), enquanto os preços dos cereais alternativos decrescem, em valor relativo, para os preços dos cereais comuns como milho e trigo, mais despesas para a SE poderão justificar-se, para levar a rentabilidade final mais próxima ou equivalente ao lucro que obteria através da utilização dos cereais comuns. Segundo os nossos resultados, os tratamentos R0-2, R0-3 e R0-4 obtiveram valores semelhantes ao nível dos parâmetros zootécnicos. Logo, podemos concluir que a SE do alimento composto à base de centeio para frangos de carne, pode ser efectuada apenas nas duas primeiras semanas do ciclo produtivo das aves, o que para os produtores avícolas representa menos um custo adicional. Com esta afirmação vamos ao encontro da hipótese principal deste estudo, que pretendia testar não ser necessária SE durante as 4 semanas de ensaio.

A maioria dos estudos já feitos está de acordo com os resultados aqui obtidos, excepto em alguns pontos onde existe discordância entre vários autores, pois ainda estão por esclarecer. Temos o caso da alteração do peso e do comprimento de alguns dos compartimentos gastrointestinais, conforme o alimento composto tenha ou não adição

enzimática. Os resultados não foram muito claros pois, no nosso caso não obtivemos valores significativamente diferentes. Mas, um estudo mais aprofundado das alterações verificadas em cada tipo de tratamento, como a espessura das paredes dos órgãos, o tamanho das vilosidades intestinais, e o peso dos compartimentos do intestino, poderiam ter ajudado a encontrar uma resposta.

Estudos futuros devem basear-se na potencial utilização de enzimas, capazes de fazer com que haja melhor utilização de alimento composto à base de cereais alternativos como o centeio, e o desenvolvimento de metodologias mais eficientes para suplementar dietas de monogástricos. Novos melhoramentos no valor nutritivo de centeio devem ser possíveis através da utilização de uma boa mistura de enzimas mas, soluções exactas exigem um estudo mais aprofundado. Pois, não só estas enzimas têm de sobreviver ao pH do TD, como ao ataque proteolítico de enzimas digestivas, e têm de conseguir fazer o seu papel nessas condições e com um significativo grau de digestão do substrato a que se destina.

Podemos dizer que o presente estudo não representa senão a continuação de vários estudos, de modo a tentar com que se consiga obter uma total compreensão e avaliação, da actuação das xilanases em alimento composto à base de centeio, e o seu efeito em frangos de carne. Assim sendo, o futuro incide na necessidade de continuação de pesquisas, principalmente no sentido de se compreender melhor os substratos, aprofundar melhor qual o papel das enzimas, e o seu modo de acção durante o processo digestivo, de modo a poder melhorá-lo.

Como conclusão final, podemos dizer que segundo os resultados obtidos, é apenas necessário adicionar SE nas duas primeiras semanas de vida das aves, sem que isso prejudique o IC e o peso. Como consequência podemos assim diminuir o preço do alimento composto fornecido aos frangos de carne.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Alam, M.J., M. A. R. Howlider, M. A. H. Pramanik, and M. A. Haque. 2003. Effect of exogenous enzyme in diet on broiler performance. *International Journal of Poultry Science* 2 (2): 168 – 173.
- Batal, A. B., and C. M. Parsons. 2002. Effects of age on nutrient digestibility in chicks fed different diets. *Poultry Science* 81: 400 – 407.
- Bedford, M.R., and H. L. Classen. 1992. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *The Journal of Nutrition* 122: 560 – 569.
- Bedford, M. R. 1993. Mode of action of feed enzymes. *Journal of Applied Poultry Science Research* 2: 85 – 92.
- Bedford, M. R. 1995. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology* 53: 145 – 155.
- Bedford, M. R. 1996a. Interaction between ingested feed and the digestive system in poultry. *Journal of Applied Poultry Science Research* 5: 86 – 95.
- Bedford, M. R. 1996b. The effect of enzymes on digestion. *Journal of Applied Poultry Science Research* 5: 370 – 378.
- Bedford, M. R. 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition-their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology* 86: 1 – 13.
- Bedford, M. R. 2002. The foundation of conducting feed enzyme research and the challenge of explaining the results. *Journal of Applied Poultry Science Research* 11: 464 – 470.

- Bedford, M. R. 2003. New enzyme technologies for poultry feeds. *British Poultry Science* 44: 1, S14 – S16.
- Boros, D., R. R. Marquardt, and W. Guenter. 1995. Rye as an alternative grain in commercial broiler feeding. *Journal of Applied Poultry Science Research* 4: 341 – 351.
- Boros, D., R. R. Marquardt, W. Guenter, and J. Brufau. 2002. Chick adaptation to diets based on milling fractions of rye varying in arabinoxylans content. *Animal Feed Science and Technology* 101: 135 – 149.
- Brenes, A., R.R. Marquardt, W. Guenter, and A. Viveros. 2002. Effect of enzyme addition on the performance and gastrointestinal tract size of chicks fed lupin seed and their fractions. *Poultry Science* 81: 670 – 678.
- Choct, M. 2006. Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World's Poultry Science Journal* 62:5-16 (Abstr.).
- Cowieson, A. J., and O. Adeola. 2005. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poultry Science* 84: 1860 – 1867.
- Cowieson, A.J., T. Acamovic, and M. R. Bedford. 2006. Using the precision-feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes – A new perspective. *Animal Feed Science and Technology* 129: 149 – 158.
- Craven, S. E.. 2000. Colonization of the intestinal tract by *Clostridium perfringens* and fecal shedding in diet-stressed and unstressed broiler chickens. *Poultry Science* 79: 843 – 849.
- Ferket, P. R..1993. Practical use of feed enzymes for turkeys and broilers. *Journal of Applied Poultry Science Research* 2: 75 – 81.
- Fontes, C.M.G.A., P.I.P. Ponte, T.C. Reis, M.C. Reis, M.C. Soares, L.T. Gama, F.M.V. Dias, and L.M.A. Ferreira. 2004. A family 6 carbohydrate-binding module potentiates the efficiency of a recombinant xylanase used to supplement cereal-based diets for poultry. *British Poultry Science* 45:5, 648-656.

- Fontes, C. M. G. A., H. J. Gilbert, G. P. Hazlewood, J. H. Clarke, J. A. M. Prates, V. A. McKie, T. Nagy, T. H. Fernandes, and L. M. A. Ferreira. 2000. A novel *Cellvibrio mixtus* family 10 xylanase that is both intracellular and expressed under non-inducing conditions. *Microbiology* 146: 1959 – 1967.
- Food and Agriculture Organization. 2007. Crop prospects and food situation. GIEWS- The global information and early warning system on food and agriculture n.º 5: Outubro. <http://www.fao.org/docrep/010/ah873e/ah873e00.htm>. Acedido em Novembro de 2007.
- Food and Agriculture Organization. FAOSTAT - © FAO *Statistics Division* 2009 - PriceSTAT. <http://faostat.fao.org/site/570/default.aspx#ancor>. Acedido em Novembro de 2008.
- Francesch, M., K. Bernard, and J. M. McNab. 2002. Comparison of two direct bioassays using 3-week-old broilers to measure the metabolisable energy of diets containing cereals high in fibre: differences between true and apparent metabolisable energy values. *British Poultry Science* 44: 580 – 587.
- Frigård, T., D. Pettersson, and P. Åman. 1994. Fiber-degrading enzyme increases body weight and total serum cholesterol in broiler chickens fed a rye-based diet. *Journal of Nutrition* 124: 2422 – 2430.
- Fuente, J. M., P. Perez De Ayala, A. Flores, and M. J. Villamide. 1998. Effect of storage time and dietary enzyme on the metabolizable energy and digesta viscosity of barley-based diets for poultry. *Poultry Science* 77: 90 – 97.
- Gracia, M. I., M. J. Aranibar, R. Lázaro, P. Mendel, and G. G. Mateos. 2003a. α -Amylase supplementation of broiler diets based on corn. *Poultry Science* 82: 436 – 442.
- Gracia, M. I., M. A. Latorre, M. García, R. Lázaro, and G. G. Mateos. 2003b. Heat processing of barley and enzyme supplementation of diets of broilers. *Poultry Science* 82: 1281 – 1291.
- Guenter, W. 1993. Impact of feed enzymes on nutrient utilization of ingredients in growing poultry. *Journal of Applied Poultry Research* 2: 82 – 84.

- Iji, P.A. 1999. The impact of cereal non-starch polysaccharides on intestinal development and function in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal* 55:375-387 (Abstr.).
- Jaroni, D., S. E. Scheideler, M. M. Beck, and C. Wyatt. 1999. The effect of dietary wheat middlings and enzyme supplementation II: apparent nutrient digestibility, digestive tract size, gut viscosity, and gut morphology in two strains of leghorn hens. *Poultry Science* 78: 1664 – 1674.
- Józefiak, D., A. Rutkowski, B. B. Jensen, and R. M. Engberg. 2007. Effects of dietary inclusion of triticale, rye and wheat and xylanase supplementation on growth performance of broiler chickens and fermentation in the gastrointestinal tract. *Animal Feed Science and Technology* 132: 79 – 93.
- Lázaro, R., M. García, P. Medel, and G. G. Mateos. 2003. Influence of enzymes on performance and digestive parameters of broilers fed rye-based diets. *Poultry Science* 82: 132 – 140.
- Lázaro, R., M. A. Latorre, P. Medel, M. Gracia, and G. G. Mateos. 2004. Feeding regimen and enzyme supplementation to rye-based diets for broilers. *Poultry Science* 83:2, 152 – 160.
- Lee, J. T., C. A. Bailey, and A. L. Cartwright. 2003. Guar meal germ and hull fractions differently affect growth performance and intestinal viscosity of broiler chickens. *Poultry Science* 82: 1589 – 1595.
- Marquardt, R. R., A. Brenes, Z. Zhang, and D. Boros. 1996. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Animal Feed Science Technology* 60: 321 – 330.
- Mathlouthi, N., L. Saulnier, B. Quemener, and M. Larbier. 2001. Comparison on the effect of two enzymes preparations on feedstuff viscosity. *British Poultry Science* 42: S53 – S54.

- Mathlouthi, N., J. P. Lallès, P. Lepercq, C. Juste, and M. Larbier. 2002. Xylanase and β -glucanase supplementation improve conjugated bile acid fraction in intestinal contents and increase villus size of small intestine wall in broiler chickens fed a rye-based diet. *Journal of Animal Science* 80: 2773-2779.
- McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, and C. A. Morgan. 2002. *Animal Nutrition*. 6th ed. Person Education Limited, Halow, England.
- Nahas, J., and M. R. Lefrançois. 2001. Effects of feeding locally grown whole barley with or without enzyme addition and whole wheat on broiler performance and carcass traits. *Poultry Science* 80: 195 – 202.
- National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th ed., National Academy Press, Washington, D.C.
- Odetallah, N. H., J. J. Wang, J. D. Garlich, and J. C. H. Shih. 2003. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. *Poultry Science* 82: 664 – 670.
- Olkowski, B. I., H. L. Classen, C. Wojnarowicz, and A. A. Olkowski. 2005. Feeding high levels of lupine seeds to broiler chickens: plasma micronutrient status in the context of digesta viscosity and morphometric and ultrastructural changes in the gastrointestinal tract. *Poultry Science* 84: 1707 – 1715.
- Pan, C. F., F. A. Igbasan, W. Guenter, and R. R. Marquardt. 1998. The effects of enzyme and inorganic phosphorus supplements in wheat- and rye-based diets on laying hen performance, energy, and phosphorus availability. *Poultry Science* 77: 83 – 89.
- Pinheiro, D. F., V. C. Cruz, J. R. Sartori, and M. L. M. Vicentini Paulino. 2004. Effect of early feed restriction and enzyme supplementation on digestive enzyme activities in broilers. *Poultry Science* 83: 1544 – 1550.
- Sabatier, A. M., and N. M. Fish. 1996. Method of analysis for feed enzymes: methodological problems?. *Journal of Applied Poultry Research* 5: 408 – 413.

- Sayyazadeh, H., G. Rahimi, and M. Rezaei. 2006. Influence of enzyme supplementation of maize, wheat and barley-based diets on the performance of broiler chickens. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9 (4): 616 – 621.
- Scott, T. A., and F. Boldaji. 1997. Comparison of inert markers [chromic oxide or insoluble ash (celiteTM)] for determining apparent metabolizable energy of wheat- or barley-based broiler diets with or without enzymes. *Poultry Science* 76: 594 – 598.
- SAS, 1991. SAS System for Linear Models, Third ed. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Sieo, C. C., N. Abdullah, W. S. Tan, and Y. W. Ho. 2005. Influence of β -glucanase-producing *Lactobacillus* strains on intestinal characteristics and feed passage rate of broiler chickens. *Poultry Science* 84: 734 – 741.
- Wang, Z. R., S. Y. Qiao, W. Q. Lu, and D. F. Li. 2005. Effects of enzyme supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. *Poultry Science* 84: 875 – 881.
- Williams P.E.V., P.A. Geraert, G. Uzu, and G. Annison. 1997. Factors affecting non-starch polysaccharide digestibility in poultry. Morand-Fehr P. (ed.). *Feed manufacturing in Southern Europe: New challenges*. CIHEAM-IAMZ, p. 125-134.
- Zhang, Z., R. R. Marquardt, W. Guenter, and G. H. Crow. 2001. Development of a multipurpose feed enzyme analyzer to estimate and evaluate the profitability of using feed enzyme preparations for poultry. *Poultry Science* 80: 1562 – 1571.